

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年2月26日 (26.02.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/016792 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/74, 1/21, C12P 21/02, C12Q 1/02, 1/68, C07K 14/47 17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010209 (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI,Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都 港区 虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル 3階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2003年8月11日 (11.08.2003) (81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) 国際出願の言語: 日本語 (84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ: 特願2002-235008 2002年8月12日 (12.08.2002) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都 千代田区 霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 中島 信孝 (NAKASHIMA,Nobutaka) [JP/JP]; 〒062-8517 北海道 札幌市 豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内 Hokkaido (JP). 田村 具博 (TAMURA,Tomohiro) [JP/JP]; 〒062-8517 北海道 札幌市 豊平区月寒東2条

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

WO 2004/016792 A1 (54) Title: NOVEL EXPRESSION VECTOR SUITABLE FOR EXPRESSION OF RECOMBINANT PROTEIN AT LOW TEMPERATURE

(54) 発明の名称: 低温での組み換えタンパク質の発現に適した新規発現ベクター

(57) Abstract: It is intended to provide an expression vector of the induction type whereby a protein can be expressed at a low temperature, and a method of expressing a protein at a low temperature with the use of this vector. Namely, an expression vector of the induction type capable of inducing the expression of a gene encoding a protein, the expression product of which inhibits the proliferation of host cells at a moderate to high temperature exceeding about 15°C, in host cells which can proliferate under low temperature conditions.

(57) 要約: 低温でタンパク質を発現することができる誘導型発現ベクターおよび該ベクターを用いて低温でタンパク質を発現させる方法の提供。 約15°Cを超える中高温条件下では発現産物が宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする遺伝子を、低温条件下で増殖可能な宿主細胞中で誘導発現し得る誘導型発現ベクター。

明 細 書

低温での組み換えタンパク質の発現に適した新規発現ベクター

技術分野

本発明は、Rhodococcus 属細菌中で外来遺伝子を誘導発現し得る発現ベクターに関する。

また、本発明は、低温において宿主細胞中で組み換えタンパク質を発現することができる誘導型発現ベクターおよび該ベクターを用いて低温で組み換えタンパク質を発現させる方法に関する。さらに、本発明は約 15°C を超える中高温条件下では発現産物が宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする遺伝子を、低温条件下で増殖可能な Rhodococcus 属細菌で誘導発現し得る Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクターおよび該ベクターを含む低温条件下で増殖可能な Rhodococcus 属細菌を用いて約 15°C を超える中高温条件下では発現産物が宿主細胞の増殖を阻害する組み換えタンパク質を低温で発現させる方法に関する。

背景技術

現在、真核生物由来のタンパク質を組み換え体として大量調製するためには大腸菌を宿主とした発現システムが広く用いられている (Weickert et al., Curr. Opin. Biotechnol. 7 494-499 (1996)、 Baneyx, Curr. Opin. Biotechnol. 10 411-421 (1999))。大腸菌は中温菌で、18°C から 37°C で生育するが、組み換えタンパク質を発現させるための培養温度も上記温度範囲内でなければならない。

しかし、真核生物由来のタンパク質がその活性を示すのもまた同じ温度範囲内であり、そのため、いくつかのタンパク質は組み換え体として大腸菌内で発現させると、大腸菌の生育を阻害してしまい、その結果、有意な量の組み換えタンパク質が得られないことがある。

大腸菌以外では Saccharomyces cerevisiae や Pichia pastoris (Cereghino and Cregg, Curr. Opin. Biotechnol. 10 422-427 (1999))、Sf9 細胞 (Miller, Curr. Opin. Genet. Dev. 3 97-101 (1993)) など真核細胞を宿主として用いた発現システムが知られているが、これらも培養温度が 30°C 前後でないと組み換えタンパク

質を効率よく発現させることが出来ず、同様の理由からその調製が困難な場合がある。例えば、組み換えタンパク質の產生に通常用いられている昆虫細胞 Sf9 を用いて外来タンパク質の產生を行う場合、その產生のための至適温度は約 28℃ であり、最低温度は約 18℃ である (Agathos et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 589 372-398 (1990)、Faber et al., Yeast 11 1331-1344 (1995))。また、酵母 (Pichia pastoris) を用いて外来タンパク質の產生を行う場合、その產生のための至適温度は約 30℃ であり、最低温度は約 15℃ である (Brock et al., J. Membr. Biol. 180 147-161 (2001)、Sarramegna et al., Protein Expr. Purif. 24 212-220 (2002))。すなわち、昆虫細胞 Sf9 の好適生育温度範囲は約 18℃ 以上であり、酵母の好適生育温度範囲は約 15℃ 以上である。またこれらを宿主とした場合、いくつかのタンパク質は糖鎖などの修飾を受けてしまい、その後の立体構造解析などの機能解析に不都合なことがある。

発明の開示

本発明は、大腸菌をはじめとする他の組み換えタンパク質発現システムで発現させることができないタンパク質を発現させることを目的とする。例えば、15℃ を超える中高温条件下で大腸菌等の形質転換宿主細胞中で発現させることができないタンパク質を低温で発現させることを目的とする。

また、本発明は、Rhodococcus 属細菌を用いて外来の組み換えタンパク質を誘導発現させることを目的とする。

上記問題を解決するためには、組み換えタンパク質の活性を抑制するために、低温で発現させることが有効だと考えられる。大腸菌においては、低温誘導性プロモーターを用いた 15～16℃ での発現システムが、最も低い温度で組み換えタンパク質を產生させた例である (特表平 10-503090、Mujacic et al., Gene 238 325-332 (1999))。また、上述のように昆虫細胞や酵母でも 15℃～18℃ での組み換えタンパク質の產生が従来知られていた最も低い温度での組み換えタンパク質の產生である。従って、従来の公知の宿主細胞を用いての組み換えタンパク質を発現させ得る最低温度である 15℃～18℃ 以下、好ましくは 4℃ 前後で発現させることが有効であると考えられた。しかし、15℃ 以下、特に 4℃ 前後では上述の宿主細胞はいずれも生育が困難であり、タンパク質の產生も不可能であるため、約

15°C以下の低温、特に4°C前後でも生育できる細菌を宿主とした発現システムを用いれば良いと考えられる。そこで、本発明者らは、Rhodococcus属細菌を宿主とした、広範な温度域（4°Cから32°C前後）において、外来蛋白質を発現せしめる誘導型発現ベクターを構築することによって、かかる問題を解決しようとした。

Rhodococcus erythropolis (Larkin et al., Antonie van Leeuwenhoek 74 133-153 (1998)) は4°Cから35°Cまでの広範な温度域で生育する放線菌で、同菌と大腸菌との両細胞種で自律複製可能な複合ベクター (De Mot et al., Microbiology 143 3137-3147 (1997)) も開発されており遺伝子工学の研究も容易である。

また Rhodococcus属細菌全般でも、大腸菌との複合ベクターが開発されており(特開平5-64589、特開平8-56669)、外来遺伝子を構成的に発現せしめる汎用的発現ベクターも存在する(特開平10-248578)。

しかし、効率よく迅速に低温でタンパク質を発現させるためには、容易に、厳密に、強力にタンパク質の発現調節が出来る誘導型発現ベクターの開発が不可欠である。すなわち、まず発現を抑制した状態で、30°Cにおいて細胞を増殖させ、その後温度を例えば4°Cに下げて発現を誘導するのである。しかし、これまでに同菌においてそのような誘導型発現ベクターの報告がなく、他種の細菌由来の発現誘導システムを流用することが有効だと考えられた。

Streptomyces coelicolor は Rhodococcus erythropolis と同じく放線菌の一種で、同菌では抗生物質チオストレプトンの添加によって発現が誘導される一連の遺伝子群が知られていた (Murakami et al., J. Bacteriol. 171 1459-1466 (1989))。そのうちの一つ TipA 遺伝子は253アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、この TipA タンパク質はチオストレプトンと共有結合し、自身のプロモーター領域に TipA-チオストレプトン複合体として作用し、自身の構造遺伝子からの転写を強力に促進することが知られていた (Holmes et al., EMBO J. 12 3183-3191 (1993)、Chiu et al., Biochemistry 35 2332-2341 (1996))。また、この TipA 遺伝子プロモーターと TipA 構造遺伝子を用いた誘導型発現ベクターも開発されており、Streptomyces属内で外来タンパク質を発現させた例がある (Enguita et al., FEMS Microbiol. Lett. 137 135-140 (1996))。 Rhodococcus erythropolis においても、TipA 構造遺伝子、並びに TipA 遺伝子プロモーターの下流に標的タンパク質の構造遺伝子を連結した遺伝子群を導入したベクターを構築すれば、この

Streptomyces 属細菌同様に、誘導型発現ベクターになりうると考えられるが、その報告はなかった。

また、約 15°C 以下の低温、特に 4°C で組み換えタンパク質を生産可能になれば、宿主の増殖を阻害するタンパク質を生産させるだけでなく、以下に述べるような利点もあると考えられる。

大腸菌で組み換えタンパク質を 37°C で発現させると、封入体と呼ばれる不活性なタンパク質の凝集を作る場合がある。しかし、同一のタンパク質でも発現時の温度を 30°C 以下にすると活性のある可溶性のタンパク質が生産される例が多数知られている (Schein and Noteborn, *Bio/Technology* 6 291-294 (1988)、 Piatak et al., *J. Biol. Chem.* 263 4837-4843 (1988)、 Schirano and Shibata, *FEBS Lett.* 271 128-130 (1990)、 Vasnia and Baneyx, *Protein Expr. Purif.* 9 211-218 (1997)、 Lin et al., *Protein Expr. Purif.* 1 169-176 (1990))。従って、約 15°C 以下の低温、特に 4°C 前後での発現システムが構築されればこの可溶化の問題も解決されると考えられる。

さらに、好適生育温度範囲が 20°C 以下の細菌である好冷菌、低温環境下に生存する変温動物、低温環境下に生存する植物由来のタンパク質も約 15°C 以下の低温、特に 4°C 前後での生産が好ましいと考えられる。これは、これらのタンパク質は温度が高い場合、活性のあるタンパク質として発現されないことがあると考えられるからである。これに関しては、好冷菌由来の α -amylase を好冷菌を宿主として発現させた例が唯一存在するもの (Tutino et al., *Extremophiles* 5 257-264 (2001))、発現誘導型のベクターではなく、迅速に大量生産させるのは困難だと考えられる。

そこで本発明者らは、Rhodococcus 属細菌中で外来タンパク質を誘導発現し得る発現ベクターおよび約 15°C 以下の低温で外来タンパク質を誘導発現し得る発現ベクターの構築について鋭意検討を行い本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 宿主細胞中で外来遺伝子を誘導物質により誘導発現し得る発現ベクターであって、該宿主以外の宿主の好適生育温度範囲以下の温度で発現し得る発現ベクター。

(2) 宿主細胞中で外来遺伝子を誘導物質により誘導発現し得る発現ベクター

であって、15°C以下の温度で発現し得る発現ベクター。

(3) 4°Cで発現し得る(1)または(2)の発現ベクター。

(4) 宿主細胞がRhodococcus属細菌である、(1)から(3)のいずれかの発現ベクター。

(5) Rhodococcus属細菌がR. erythropolis、R. fasciansおよびR. opacusからなる群から選択される、(4)の発現ベクター。

(6) 誘導物質がチオストレプトンである、(1)から(5)のいずれかの発現ベクター。

(7) 外来遺伝子が、15°Cを超える中高温条件下で宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする、(1)から(6)のいずれかの発現ベクター。

(8) 誘導物質により発現を調節し得るプロモーター配列、外来遺伝子を導入可能なマルチクローニング部位を含む(1)から(7)のいずれかの発現ベクター。

(9) (1)から(8)のいずれかの発現ベクターを含む形質転換体。

(10) (1)から(8)のいずれかの発現ベクターを用いてタンパク質を產生する方法。

(11) 宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする遺伝子を、該宿主細胞の好適生育温度範囲より低い好適生育温度範囲を有する他の宿主細胞中で誘導物質により誘導発現し得る誘導型発現ベクター。

(12) 4°Cで発現し得る(11)の発現ベクター。

(13) 宿主細胞がRhodococcus属細菌である、(11)または(12)の発現ベクター。

(14) Rhodococcus属細菌がR. erythropolis、R. fasciansおよびR. opacusからなる群から選択される、(13)の発現ベクター。

(15) 誘導物質がチオストレプトンである、(11)から(14)のいずれかの発現ベクター。

(16) 誘導物質により発現を調節し得るプロモーター配列、外来遺伝子を導入可能なマルチクローニング部位を含む(11)から(15)のいずれかの発現ベクター。

(17) (11) から (16) のいずれかの発現ベクターを含む形質転換体。

(18) (11) から (16) のいずれかの発現ベクターを用いてタンパク質を产生する方法。

(19) Rhodococcus 属細菌中で外来遺伝子を誘導物質により誘導発現し得る発現ベクター。

(20) Rhodococcus 属細菌が R. erythropolis、R. fascians および R. opacus からなる群から選択される、(19) の発現ベクター。

(21) 誘導物質がチオストレプトンである、(19) または (20) の発現ベクター。

(22) TipA 遺伝子プロモーター配列、外来遺伝子を導入可能な第1のマルチクローニング部位および転写終結配列を含む発現カセット、第2のプロモーター配列および TipA 遺伝子を含む誘導カセット、Rhodococcus 属細菌用プラスミドの自律複製に必須な DNA 領域ならびにチオストレプトン耐性遺伝子を含む、(19) から (21) のいずれかの発現ベクター。

(23) (19) から (22) のいずれかの発現ベクターを含む Rhodococcus 属細菌形質転換体。

(24) (19) から (22) のいずれかの発現ベクターを用いてタンパク質を产生する方法。

(25) 15°C を超える中高温条件下では発現産物が宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする遺伝子を、低温条件下で増殖可能な Rhodococcus 属細菌で誘導発現し得る Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター。

(26) TipA 遺伝子プロモーター配列、外来遺伝子を導入可能な第1のマルチクローニング部位および転写終結配列を含む発現カセット、第2のプロモーター配列および TipA 遺伝子を含む誘導カセット、Rhodococcus 属細菌用プラスミドの自律複製に必須な DNA 領域ならびにチオストレプトン耐性遺伝子を含む、外来遺伝子を低温条件下で増殖可能な Rhodococcus 属細菌内で誘導発現し得る Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター。

(27) さらに大腸菌用プラスミドの自律複製に必須な DNA 領域を含み、大腸菌中で複製可能な (26) の Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター。

(28) TipA 遺伝子プロモーターが TipA-LG10 プロモーターである (26) ま

たは（27）のRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター。

（29）配列番号106に表される塩基配列を有するpTip-NH1、配列番号107に表される塩基配列を有するpTip-NH2、配列番号108に表される塩基配列を有するpTip-CH1、配列番号109に表される塩基配列を有するpTip-CH2、配列番号110に表される塩基配列を有するpTip-LNH1、配列番号111に表される塩基配列を有するpTip-LNH2、配列番号112に表される塩基配列を有するpTip-LCH1、配列番号113に表される塩基配列を有するpTip-LCH2、pTip-CH1.1、pTip-CH2.1、pTip-LCH1.1およびpTip-LCH2.1からなる群から選択される（26）から（28）のいずれかのRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター。

（30）Rhodococcus属細菌がR. erythropolis、R. fasciansおよびR. opacusからなる群から選択される、（25）から（29）のいずれかのRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター。

（31）（25）から（30）のいずれかのRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクターを含むRhodococcus属細菌形質転換体。

（32）外来遺伝子として15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をコードする遺伝子を含む（25）から（30）のいずれかのRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能なRhodococcus属細菌に導入し、低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記Rhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター導入細菌を培養することを含む、15℃を超える中高温条件下では発現産物が宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質を低温で産生させる方法。

（33）15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、15℃を超える中高温条件下では宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質である、（32）のタンパク質を低温で産生させる方法。

（34）15℃を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、大腸菌で15℃を超える中高温で発現させた場合に不活性な封入体を作るタンパク質である、（32）のタンパク質を低温で産生させる方法。

（35）好冷菌または低温環境下に生存する動物もしくは植物由来のタンパク質をコードする遺伝子を含む（25）から（30）のいずれかのRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能なRhodococcus属細菌に導入し、低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記Rhodococcus属細菌用誘導

型発現ベクター導入細菌を培養することを含む、好冷菌または低温環境下に生存する動物もしくは植物由来のタンパク質を低温で產生させる方法。

(36) 外来遺伝子を含む(25)から(30)のいずれかのRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能なRhodococcus属細菌に導入し、15°Cを超える中高温条件下および低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記Rhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター導入細菌を培養し、15°C以下の低温条件下でのみ発現される遺伝子を選択することを含む、15°Cを超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングする方法。

(37) 15°Cを超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、15°Cを超える中高温条件下では宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質である、(36)の15°Cを超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングする方法。

(38) 大腸菌に導入し15°Cを超える中高温で発現させよとした場合に、発現しないかまたは大腸菌の増殖を阻害する遺伝子を選択し、次いで該遺伝子を外来遺伝子として含む(25)から(30)のいずれかのRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能なRhodococcus属細菌に導入し、低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記Rhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター導入細菌を培養したときに発現しうる遺伝子を選択することを含む、15°Cを超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングする方法。

(39) 15°Cを超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、大腸菌の増殖を30°C以上で阻害するタンパク質である、(38)のタンパク質をスクリーニングする方法。

(40) 15°Cを超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、大腸菌で15°Cを超える中高温で発現させた場合に封入体を作るタンパク質である、(38)のタンパク質をスクリーニングする方法。

(41) 15°Cを超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、15°Cを超える中高温条件下では宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質である、(38)の15°Cを超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングする方法。

(42) (36)から(41)のいずれかのスクリーニングする方法により得

られた 15°C を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質。

以下、本発明を詳細に説明する。

1. 本発明の発現ベクターの構築

本発明の発現ベクターは、低温で増殖可能な細胞中で自律複製可能で、該ベクター中に組込まれた外来遺伝子を誘導的に発現し得るベクター、すなわち誘導型発現ベクターである。

低温で増殖可能な細胞は限定されず、低温で増殖できる細胞ならば大腸菌、酵母等のいずれの微生物、昆虫細胞、哺乳類細胞等も使用しうる。確実に低温で増殖し得るという点で Rhodococcus 属に属する細菌、好ましくは R. erythropolis、R. fascians、R. opacus 等が挙げられる。これら 3 種類の Rhodococcus 属細菌のうち、R. erythropolis が 4°C での増殖速度が最も大きく他の 2 種はそれよりも劣る。しかし、本発明のベクターを用いたタンパク質の產生においては、細胞を増殖に適した温度で増殖させた後に、該細胞を低温に移して誘導的に発現させタンパク質を產生させ得る。従って、4°C で組み換え外来タンパク質を発現產生可能な限り増殖速度は問題とならず、R. erythropolis、R. fascians、R. opacus の 3 種の Rhodococcus 属に属する種すべてを好適に用い得る。

低温とは、通常の細菌の至適増殖温度よりも低い温度をいい、4°C から 18°C、好ましくは 4°C から 15°C、特に好ましくは 4°C 前後の温度をいう。通常の細菌の好適生育温度範囲は細菌の種類によっても異なるが約 15°C から約 40°C または約 18°C から約 40°C であり、本明細書においては約 15°C を超える温度を中高温という。

外来遺伝子とは、本発明のベクターを用いて発現產生させようとする標的タンパク質をコードする遺伝子であり、宿主細胞以外の生物由来のタンパク質をコードする遺伝子をいう。本発明のベクターに組込む外来遺伝子は、約 15°C を超える中高温で発現させることが困難であるかまたは不可能なタンパク質をコードする遺伝子である。約 15°C を超える中高温で発現させることが困難であるかまたは不可能なタンパク質とは約 15°C を超える中高温で発現させようとしても、発現効率が低いか全く発現しないタンパク質をいう。このようなタンパク質として宿主細胞の至適生育温度範囲内の温度で発現できないが同一のまたは異なる種類の宿主細胞を用いた場合にその微生物の好適生育温度範囲内の温度よりも低温で発現できるタンパク質、宿主微生物の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該

宿主細胞にとって致死性となるが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温ではそれらの宿主細胞に致死性でないタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞の増殖を阻害するが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温ではそれらの宿主細胞の増殖を阻害しないタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に封入体と呼ばれる不活性なタンパク質の凝集を作るが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温でそれらの宿主細胞で発現させた場合に活性のある可溶性タンパク質となるタンパク質、好適生育温度範囲が 20°C 以下である好冷菌、低温環境下に生存する変温動物、低温環境下に生存する植物由来のタンパク質等をコードする遺伝子が挙げられる。

ある遺伝子を大腸菌に基づく発現系で約 15°C を超える中高温で発現させようとしたとき、または該遺伝子を本発明の発現ベクターに含ませ Rhodococcus 属細菌で約 15°C を超える中高温で発現させようとしたときに、発現しないかまたは発現量が外来遺伝子を本発明の発現ベクターに含ませ Rhodococcus 属細菌で低温で発現させたときの発現量より有意に低い場合に、該タンパク質は約 15°C を超える中高温で発現させることが困難であるかまたは不可能なタンパク質であるといえる。

例えば、通常組み換えタンパク質の発現産生によく用いられる大腸菌を用いて発現させようとした場合に、大腸菌の好適生育温度範囲である 18°C から 37°C で発現できないか、大腸菌に致死的となるか、大腸菌の増殖を阻害するか、大腸菌内で凝集し不活性な封入体を作るタンパク質をコードする遺伝子を、Rhodococcus erythropolis に導入して Rhodococcus erythropolis を 4°C から 18°C の低温で増殖させることにより前記タンパク質を効率的に大量に産生させることができる。また、Rhodococcus erythropolis を用いて約 15°C を超える温度で発現させようとした場合に、発現できないか、Rhodococcus erythropolis に致死的となるか、Rhodococcus erythropolis の増殖を阻害するようなタンパク質を、Rhodococcus erythropolis を用いて 4°C から 15°C の低温で増殖させても前記タンパク質を効率的に大量に産生させることができる。

約 15°C を超える中高温条件下で宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質の種類

は限定されないが、例えば後述の実施例に記載のタンパク質を例示することができる。これらのタンパク質をコードする遺伝子は、後述のプロモーターの下流にマルチクローニング部位を含ませておきその部位にコードする遺伝子を組めばよい。

外来遺伝子を誘導的に発現し得るベクターとは、一定の処理を施すことにより組込まれた外来遺伝子の発現が誘導されるベクターをいう。例えば、特定の調節物質で発現を誘導し得るプロモーターをベクターに組込むことにより誘導型発現ベクターを構築することが可能である。このようなプロモーターとして宿主細胞の培養培地中に誘導物質である薬剤を導入することにより特異的に誘導するプロモーターがあり、例えばチオストレプトン誘導性プロモーターである TipA 遺伝子プロモーターが挙げられる。このような誘導性プロモーターを組んだベクターを導入した宿主細胞を 15°C から 18°C 以上の細胞の増殖に適した温度で十分増殖させた後に、タンパク質の発現を誘導する薬剤を添加することにより目的のタンパク質を大量に発現させることができる。さらに、TipA タンパク質をコードする TipA 遺伝子、TipA 遺伝子の発現を誘導する ThcA 遺伝子プロモーター等の適当なプロモーターを組めばよい。宿主細胞が Rhodococcus 属に属する細菌である場合、該細菌はチオストレプトンに対して感受性であるため、チオストレプトンに対しての耐性を付与するチオストレプトン耐性遺伝子等を組込む。

また、本発明の発現ベクターは、薬剤耐性遺伝子を含んでいてもよい。

さらに、複数の宿主細胞に適合させるために複合ベクター（シャトルベクター）であってもよい。例えば、大腸菌および Rhodococcus 属に属する細菌のいずれにも導入可能でこれらの宿主細胞中で外来遺伝子を発現しうるベクターが挙げられる。このようなベクターを構築する場合、それぞれの宿主細胞でプラスミドの自律複製に必須な DNA 領域を組込んでおく必要がある。例えば、大腸菌と Rhodococcus 属に属する細菌に適した複合ベクターの場合、大腸菌用プラスミドの自律複製に必須な DNA 領域として Cole1 配列を、Rhodococcus 属に属する細菌用プラスミドの自律複製に必須な DNA 領域として RepA および RepB 遺伝子を組めばよい。このような複合ベクターは大腸菌を用いて大量に複製することが可能である。

本発明の発現ベクターは、少なくとも第 1 のプロモーター活性を有する DNA 配

列、外来遺伝子を組込むための第1のマルチクローニング部位を含む。さらに、第1のプラスミドの自律複製に必須なDNA領域、第1の薬剤耐性遺伝子、第1のマルチクローニング部位に連結された外来遺伝子、第1の転写終結配列を含む。第1のプロモーター活性を有するDNA配列としてTipA遺伝子プロモーターが挙げられ、TipA遺伝子プロモーターを含む場合、TipA遺伝子、およびTipA遺伝子を発現させるためのThcA遺伝子プロモーター等の第2のプロモーター配列、TipA遺伝子下流の第2の転写終結配列を含む。TipA遺伝子プロモーターはTipA-LG10プロモーター等のその配列を改変させたものでもよい。さらに、TipA遺伝子プロモーター誘導発現系を含む場合であって、宿主細胞がRhodococcus属細菌である場合には、Rhodococcus属細菌にチオストレプトンに対する耐性を付与するためチオストレプトン耐性遺伝子を含んでいる必要がある。

プロモーター活性を有するDNA配列、外来遺伝子および転写終結配列は発現力セット(Expression cassette)を構成し、TipA遺伝子およびTipA遺伝子発現用プロモーターは誘導力セット(Inducer cassette)を構成する。

本発明のRhodococcus属細菌用発現ベクターは、タンパク質自体が15°Cを超える中高温で発現可能なものならば低温ばかりでなく15°Cを超える中高温においても該タンパク質を発現させ得る。

本発明の発現ベクターとして、図9に記載のpTipベクターが挙げられ、マルチクローニング部位の構造により図9aに示すようにpTip-NH1、pTip-NH2、pTip-CH1、pTip-CH2、pTip-LNH1、pTip-LNH2、pTip-LCH1およびpTip-LCH2がある。pTip-NH1、pTip-NH2、pTip-CH1、pTip-CH2、pTip-LNH1、pTip-LNH2、pTip-LCH1およびpTip-LCH2ベクターの配列はそれぞれ、配列番号106～113に示される。

さらに、本発明の発現ベクターとして、pTip-CH1、pTip-CH2、pTip-LCH1、pTip-LCH2において、マルチクローニング部位のXhoI部位以降の読み枠を市販のpETベクター(Novagen社)の読み枠と一致させるためにBglIIとXhoI部位を分けたpTip-CH1.1、pTip-CH2.1、pTip-LCH1.1、pTip-LCH2.1がある。

本発明のベクターは、後述の実施例の記載および図1から図8のベクター構築図に従えば容易に構築することができる。

2. 本発明のベクターの使用

本発明の発現ベクターを用いて、約15°Cを超える中高温で発現させることができ

難であるかまたは不可能なタンパク質を産生させることができる。このようなタンパク質として、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現できないが同一のまたは異なる種類の宿主細胞を用いた場合にその細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温で発現できるタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞にとって致死性となるが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温ではそれらの宿主細胞に致死性でないタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞の増殖を阻害するが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の至適温度よりも低温ではそれらの宿主細胞の増殖を阻害しないタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に封入体と呼ばれる不活性なタンパク質の凝集を作るが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の至適温度よりも低温でそれらの宿主細胞で発現させた場合に活性のある可溶性タンパク質となるタンパク質、好適生育温度範囲が 20°C 以下である好冷菌、低温環境下に生存する変温動物、低温環境下に生存する植物由来のタンパク質が挙げられる。

これらのタンパク質をコードする遺伝子を本発明の発現ベクターのマルチクローニング部位に適当な制限酵素を用いて組込み、該ベクターで宿主細胞を形質転換し、宿主細胞を低温条件下で培養することにより前記タンパク質を発現させることができる。宿主細胞は、低温で増殖し得る細胞である必要があり、*Rhodococcus* 属に属する細菌、好ましくは *R. erythropolis*、*R. fascians*、*R. opacus* 等が挙げられる。これらの細胞は低温で増殖可能であるが、増殖に好適な温度は 15°C 以上、さらに好適な温度は 18°C 以上、特に好適な温度は約 30°C 前後であり、遺伝子を組込んだタンパク質を発現させる前に、増殖に適した温度で十分増殖させたのちに、低温条件下に移しベクター中に含まれる誘導型プロモーターの機能を利用して適当な薬剤を用いてタンパク質を発現させることができる。

本発明のベクターが、*TipA* 遺伝子プロモーターを含む場合、チオストレプトンを培地に添加することによりタンパク質の発現が誘導される。この際チオストレプトンは、終濃度 0.1 μ g/ml 以上、好ましくは 1 μ g/ml 以上となるように添加すればよい。ただし、10 μ g/ml を越えると生育が悪くなる。

本発明のベクターを用いて、約 15°C を超える中高温で発現させることが困難であるかまたは不可能なタンパク質をスクリーニングすることができる。このよう

なタンパク質として、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現できないが同一のまたは異なる種類の宿主細胞を用いた場合にその細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温で発現できるタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞にとって致死性となるが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温ではそれらの宿主細胞に致死性でないタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞の増殖を阻害するが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の至適温度よりも低温ではそれらの宿主細胞の増殖を阻害しないタンパク質、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に封入体と呼ばれる不活性なタンパク質の凝集を作るが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の至適温度よりも低温でそれらの宿主細胞で発現させた場合に活性のある可溶性タンパク質となるタンパク質が挙げられる。

例えば、適当な動物種の適当な組織から poly (A)⁺RNA を抽出し、cDNA を合成し、発現ベクターに組込む。次いで、該ベクターを用いて大腸菌等の宿主細胞を形質転換し、発現ライブラリーを構築し、30℃で増殖発現させた場合に、増殖が阻害されるクローンから組込まれた遺伝子を単離することにより、宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞にとって致死性となるが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度よりも低温ではそれらの宿主細胞に致死性でないタンパク質または宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞の増殖を阻害するが同一のまたは異なる種類の宿主細胞の至適温度よりも低温ではそれらの宿主細胞の増殖を阻害しないタンパク質をコードする遺伝子を選択する。この際、発現ベクターに適当な薬剤で誘導されるプロモーターを組込んでおき薬剤で発現を誘導した場合に宿主細胞の増殖が阻害され、誘導しない場合には宿主細胞が増殖するようなクローンを選択すればよい。次いで、単離した遺伝子を本発明の発現ベクターに組込んで、該組み換え発現ベクターで *Rhodococcus erythropolis* を形質転換し、4℃から 15℃の低温で増殖発現させ、増殖が阻害されることなく前記遺伝子を発現するクローンを選択することにより、上記タンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングすることができる。また、cDNA ライブラリーの遺伝子を本発明の発現ベクターに組込んで、該組み換え発現ベクターで *Rhodococcus erythropolis* を形質転換し、低温

または約 15°C を超える中高温で培養し、増殖が阻害されることなく組込んだ遺伝子を発現するクローンを選択するか、または発現誘導させたときに発現される遺伝子を組込んだクローンを選択することにより上記タンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングすることができる。

前記スクリーニングにより得られた約 15°C を超える中高温で発現させることが困難であるかまたは不可能なタンパク質も本発明に包含される。このようなタンパク質として、後述の実施例に記載されたタンパク質が例示できる。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2002-235008 号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図 1 は、誘導型発現ベクターのバックボーンになるプラスミド pHN136 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対 (キロベースペア : kb) を示す。

図 2 は、チオストレプトン耐性遺伝子を持つプラスミド pHN143 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対 (キロベースペア : kb) を示す。CIAP は Calf Intestine Alkaline Phosphatase を、Blu. は平滑末端 (Blunt end) を意味する。

図 3 は、Inducer cassette を持つプラスミド pHN62 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対 (キロベースペア : kb) を示す。Blu. は平滑末端 (Blunt end) を意味する。

図 4 は、Expression cassette を持つプラスミド pHN153 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対 (キロベースペア : kb) を示す。CIAP は (Calf Intestine Alkaline Phosphatase を Blu. は平滑末端 (Blunt end) を意味する。

図 5 は、テトラサイクリン耐性遺伝子を持つプラスミド pHN169 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対 (キロベースペア : kb) を示す。CIAP は Calf Intestine Alkaline Phosphatase を、Blu. は平滑末端 (Blunt end) を意味する。

図 6 は、PIP をレポーター遺伝子として持つ誘導型発現ベクタープラスミド

pHN170、pHN171 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置を示す。数字は塩基対（キロベースペア : kb）を示す。CIAP は Calf Intestine Alkaline Phosphatase を意味する。図 6 において一連の工程を 2 つに分けて示してあるが、工程の順序が明確になるように両者には重複部分がある。

図 7 は、マルチクローニング部位を持つ誘導型発現ベクタープラスミド pTip-NH1、pTip-CH1、pTip-LNH1、pTip-LCH1 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対（キロベースペア : kb）を示す。図 7 において一連の工程を 2 つに分けて示してあるが、工程の順序が明確になるように両者には重複部分がある。

図 8 は、マルチクローニング部位を持つ誘導型発現ベクタープラスミド pTip-NH2、pTip-CH2、pTip-LNH2、pTip-LCH2 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置をしめす。数字は塩基対（キロベースペア : kb）を示す。図 8 において一連の工程を 2 つに分けて示してあるが、工程の順序が明確になるように両者には重複部分がある。

図 9 a は、a) pTip-NH1、pTip-CH1、pTip-LNH1、pTip-LNH1、pTip-NH2、pTip-CH2、pTip-LNH2、pTip-LCH2 のマップを示す図である。各領域の機能と、プラスミドのマップを示す。

図 9 b は、b) pTip-NH1、pTip-LNH1 の TipA 遺伝子プロモーター配列、または TipA-LG10 プロモーター配列から、マルチクローニング部位、ThcA 遺伝子転写終結配列までの DNA 配列を示す。

図 9 c は、c) pTip-CH1、pTip-LCH1 の TipA 遺伝子プロモーター配列、または TipA-LG10 プロモーター配列から、マルチクローニング部位、ThcA 遺伝子転写終結配列までの DNA 配列を示す。

図 9 d は、d) pTip-NH2、pTip-LNH2 の TipA 遺伝子プロモーター配列、または TipA-LG10 プロモーター配列から、マルチクローニング部位、ThcA 遺伝子転写終結配列までの DNA 配列を示す。

図 9 e は、e) pTip-CH2、pTip-LCH2 の TipA 遺伝子プロモーター配列、または TipA-LG10 プロモーター配列から、マルチクローニング部位、ThcA 遺伝子転写終結配列までの DNA 配列を示す。

図 10 は、pTip-CH1.1、pTip-LCH1.1、pTip-CH2.1 および pTip-LCH2.1 のマッ

プを示す図である。

図 1 1 は、PIP 活性測定のためのコントロールプラスミド pHN172、pHN173 の構築図である。図中に制限酵素認識部位と構造遺伝子の位置を示す。数字は塩基対（キロベースペナー : kb）を示す。また、CIAP は Calf Intestine Alkaline Phosphatase を意味する。pHN170 は、「Expression cassette」と「Inducer cassette」両方をもつのに対して、pHN173 は「Expression cassette」のみをもち、pHN172 は両 cassette を持たない。

図 1 2 は、誘導型発現ベクターを用いた PIP 活性の測定 1 の結果を示す図である。

図 1 3 は、誘導型発現ベクターを用いた PIP 活性の測定 2 a の結果を示す図である。

図 1 4 は、誘導型発現ベクターを用いた PIP 活性の測定 2 b を示す図である。

図 1 5 は、誘導型発現ベクターを用いた PIP 活性の測定 3 の結果を示す図である。

図 1 6 は、誘導型発現ベクターを用いた外来タンパク質の精製 1 の結果を示す写真である。

図 1 7 は、誘導型発現ベクターを用いた外来タンパク質の精製 2 の結果を示す写真である。

図 1 8 は、誘導型発現ベクターを用いた外来タンパク質の精製 3 a の結果を示す写真である。

図 1 9 は、誘導型発現ベクターを用いた外来タンパク質の精製 3 b の結果を示す図である。

図 2 0 は、大腸菌の増殖を 30℃で阻害するタンパク質のリストを示す図である。

図 2 1 は、Rhodococcus erythropolis、大腸菌を宿主とした外来タンパク質の発現を示す図である。

図 2 2 は、TipA 遺伝子プロモーター配列を示す図である。

図 2 3 は、TipA 遺伝子プロモーター中の RBS 配列 (WT RBS) の LG10 RBS への改良を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

[実施例 1]

Rhodococcus erythropolis 由来の、Rhodococcus 属細菌内で自律複製可能なプラスミドの分離とその一部 DNA 配列の決定

Rhodococcus erythropolis と大腸菌の複合ベクターを作成するために、まず Rhodococcus 属細菌内に存在する小型の内在性プラスミドを検索した。すると、Rhodococcus erythropolis JCM2895 株にその存在が確認された。このプラスミドに pRE2895 と名前を付けた。以下にプラスミドの分離と、その DNA 配列決定について具体的に述べる。

Rhodococcus erythropolis JCM2895 株を 5ml の LB 培地 (1% Difco Bacto Tryptone, 0.5% Difco Yeast Extract, 1.0% 塩化ナトリウム) にて、30°C で 30 時間培養した菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN 社製) を用いて pRE2895 を精製した。この際、Buffer P1 250 μl に懸濁後、Buffer P2 250 μl を加える前に、5 μl のリゾチーム (100mg/ml) を加え 37°C で 30 分インキュベートした点を除いては、使用説明書通りに作業した。

上記 DNA サンプルを制限酵素 EcoRI で処理し、1.0% アガロースゲル電気泳動 (100V、30 分) に供したところ、約 5.4kb の DNA 断片 1 本の存在が確認された。

この約 5.4kb の DNA 断片をゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、使用説明書通りに精製した。得られた EcoRI 断片を常法 (Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) に従って、プラスミド pBluescript II SK (+) (STRATAGENE 社製) の EcoRI 部位にサブクローンし、このプラスミドに pHN79 と名前を付けた。

pHN79 を Reverse、M13-20 両プライマー (共に STRATAGENE 社製) を用い、DNA シーケンサー ABI PRISM(R) 3100 Genetic Analyzer (ABI 社製) を用いて、使用説明書に準じて、pHN79 の塩基配列を約 400 塩基ずつそれぞれ決定した。相同性検索の結果、pHN79 にサブクローンされた Rhodococcus erythropolis JCM2895 株由来の DNA 領域はその 99.8% の配列が GenBank に受入番号 AF312210 として登録されている 5403 塩基対の環状 DNA、pN30 と一致した。

分離した pRE2895 は全塩基配列を決定しなかったが、pN30 との相同意は極めて高く、また制限酵素切断地図も pN30 の配列から予想されるものと一致したことから、これらの相同意はプラスミド全体にわたっていると予想された。また、pN30 は Mycobacterium fortuitum 002 株から分離された内在性プラスミド pAL5000 (Rauzer et al., Gene 71 315-321 (1988)、Stolt and Stoker, Microbiology 142 2795-2802 (1996))、Rhodococcus erythropolis NI86/21 株から分離された pFAJ2600 (De Mot et al., Microbiology 143 3137-3147 (1997)) と相同意が高く、類似の機構で自律複製していると考えられた。pAL5000 は推定 RepA 遺伝子、推定 RepB 遺伝子、推定複製開始点を含む領域のみで各細菌内で自律複製するため十分であるため、本発明者らが分離した pRE2895 も同様の領域のみを発現ベクター中に組み込めば、Rhodococcus 属細菌内で自律複製するために十分と考えられた。

〔実施例 2〕

ベクタープラスミド pHN136 の構築

実施例 1 で分離した pRE2895 の一部と大腸菌内で自律複製可能なプラスミドの一部を用いて両菌の複合ベクターを作成するため以下の作業を行った（図 1）。

プラスミド pBluescript II SK (-) (STRATAGENE 社製) をテンプレートとして、配列表中の配列番号 1、2 に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチドプライマー（以下プライマーと略記）を用いて、ポリメラーゼチェーンリアクション法（以下、PCR と略記： Saiki et al., Science, 239 487-491 (1988)）による DNA の増幅を行った。なお、用いた PCR 用の酵素は Pfu turbo (STRATAGENE 社製) である。その結果、アンピシリン耐性遺伝子（図中においては Amp^r と表記）と大腸菌内で自律複製させるために必要な ColE1 配列領域を含む 2.0kb の増幅された DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 SacI と BsrGI で二重消化し、1.0%アガロースゲル電気泳動（100V、30 分）に供し、該 DNA 断片を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit を用いて、使用説明書に準じて精製した。

一方、pN30（実施例 1）の配列をもとに Rhodococcus 属細菌内で自律複製するために必要と思われる領域を増幅するプライマーを設計した。なお、同プライマーの配列は配列表中の配列番号 3、4 で示される。プラスミド pHN79 をテンプレートとして、両プライマーを用いて PCR による増幅を行ったところ 1.9kb の増幅

された DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 BsrGI と SacI で二重消化し、1.0% アガロースゲル電気泳動（100V、30 分）に供し、該 DNA 断片を切り出し、上述の方法と同様に精製した。

上記 2 つの精製された DNA 断片を DNA Ligation Kit Ver. 2（宝酒造社製）を用いて、使用説明書通りにライゲーションし、得られたプラスミドに pHN129 と名前を付けた。

次に pHN129 に存在する制限酵素認識部位 BamHI、SalI を除去するため以下の作業をおこなった。まず、pHN129 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 5、6 に記載のプライマーを用いて、PCR による增幅を行った。この PCR 断片を BglII と PstI で二重消化して得られた 0.5kb の DNA 断片を pHN129 の BamHI、PstI 部位にサブクローンした。結果、BglII と BamHI で連結された部分においては推定 RepA 遺伝子のオープンリーディングフレーム（以下 ORF と略記）内であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、BamHI 認識部位が除去された。また SalI 認識部位は BamHI 認識部位のごく近傍に存在したが、配列番号 5 に記載のプライマー中において、SalI 認識部位が除かれ、かつ、コードされるアミノ酸が置換されないよう設計されていることから、BamHI 認識部位と同時に SalI 認識部位も除去されている。このプラスミドに pHN135 と名前を付けた。

次に pHN135 に存在する制限酵素認識部位 BglII を除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミド pHN135 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 5、6 に記載のプライマーを用いて、PCR による增幅を行った。この PCR 断片を PstI と BamHI で二重消化して得られた 0.5kb の DNA 断片を pHN135 の PstI、BglII 部位にサブクローンした。結果、BamHI と BglII で連結された部分においては推定 RepB 遺伝子の ORF 部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、BglII 認識部位が除去された。この結果得られたプラスミドに pHN136 と名前をつけた。

〔実施例 3〕

ベクタープラスミド pHN143 の構築

タンパク質の発現誘導には抗生物質チオストレプトンを用いるが、Rhodococcus erythropolis は同物質に対して感受性であるために、耐性を付与させなければならない。そこで Streptomyces azureus が持つチオストレプトン耐性遺伝子、tsr

遺伝子 (Bibb et al., Mol. Gen. Genet. 199 26-36 (1985) : 図中においては、Thio^rと表記する) を複合ベクター中に組み込むこととした。なお、この遺伝子が Rhodococcus erythropolis 内で機能し、チオストレプトン耐性を付与することはすでに報告されている (Shao and Behki, Lett. Appl. Microbiol. 21 261-266 (1995))。以下に、同遺伝子の分離について具体的に述べる (図 2)。

まず、PCR のテンプレートに使用する Streptomyces azureus JCM4217 株のゲノム DNA を以下のように調製した。5ml の SB 培地 (1% Difco Bacto Tryptone、0.5% Difco Yeast Extract、0.5% 塩化ナトリウム、0.1% Glucose、5mM 塩化マグネシウム、0.5% グリシン) にて 30°C で培養した同菌株を 500 μl の SET バッファー (75mM 塩化ナトリウム、25mM EDTA (pH8.0)、20mM Tris-HCl (pH7.5)) に懸濁した。そこに、5 μl のリゾチーム溶液 (100mg/ml) を加え、37°C で 30 分インキュベートした。そして、14 μl のプロテアーゼ K 溶液 (20mg/ml) と 60 μl の硫酸ドデシルナトリウム溶液 (10%) を加え、よく混合した後 55°C で 2 時間インキュベートした。その後、200 μl の塩化ナトリウム溶液 (5M) と 500 μl のクロロホルムを加え、20 分間室温で回転攪拌した。遠心分離し、700 μl の上清をとった。これをイソプロパノール沈殿後、乾燥させ、50 μl の TE 溶液 (10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA (pH8.0)) に溶解した。

上記のように精製した Streptomyces azureus JCM4217 株のゲノム DNA をテンプレートとして、配列表中の配列番号 7、8 に記載のプライマーを用いて、PCR による增幅を行った。その結果、チオストレプトン耐性遺伝子を含む 1.1kb の増幅された DNA を得た。なおこの DNA 断片はプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼ (Gibco BRL 社製) を用いたため、その末端は平滑末端である。この DNA 断片を精製し、常法 (Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) に従い 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した後、プラスミド pGEM-3Zf (+) (Promega 社製) の HincII 部位にサブクローンした (サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から HindIII 認識部位-tsr 遺伝子 ORF-EcoRI 認識部位である)。このプラスミドに pHN137 と名前を付けた。

次に pHN137 に存在する制限酵素認識部位 SalII を除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミド pHN137 をテンプレートとして、配列表中の配列番号

9、10に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはプラチナPfx DNAポリメラーゼを用いた。このPCR断片の片方の末端をHindIIIで消化して得られた0.6kbのDNA断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミドpHN137をテンプレートとして、配列表中の配列番号11、12に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはプラチナPfx DNAポリメラーゼを用いた。このPCR断片の片方の末端をEcoRIで消化して得られた0.5kbのDNA断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の5'末端をT4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら2つのPCR断片を同時にプラスミドpGEM-3Zf(+)のHindIII、EcoRI部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においてはtsr遺伝子のORF部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、SalI認識部位が除去された。このプラスミドにpHN143と名前を付けた。

〔実施例4〕

ベクタープラスミドpHN62の構築

チオストレプトンによって誘導型発現をさせるためにはRhodococcus属細菌内にTipAタンパク質を存在させなければならない。そのために、Rhodococcus erythropolisから構成的なプロモーターを分離し、その下流にTipAタンパク質をコードする構造遺伝子を連結した(図3)。構成的に機能するプロモーターとしてはRhodococcus erythropolisのアルデヒドデヒドロゲナーゼ様タンパク質をコードするThcA遺伝子(Nagy et al., J. Bacteriol. 177 676-687 (1995))のプロモーター配列を用いた。

テンプレートに使用するStreptomyces coelicolor A3(2)株のゲノムDNAはStreptomyces azureusからゲノムDNAを調製したときと同様に作業し、精製した。また、Rhodococcus erythropolis JCM3201株のゲノムDNAは5mlのLB培地で培養した点を除いてはStreptomyces azureusからゲノムDNAを調製したときと同様に作業し、精製した。

上述のように精製したStreptomyces coelicolor A3(2)株のゲノムDNAをテンプレートとして、配列表中の配列番号13、14に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。なおこのPCRにはプラチナPfx DNAポリメラーゼを用

いた。その結果、TipA 遺伝子の ORF 並びにその下流の転写終結配列を含む DNA (図中においては TipA と表記) を得た。

この PCR 断片の片方の末端を BglIII で消化して得られた 0.9kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、上述のように精製した Rhodococcus erythropolis JCM3201 株のゲノム DNA をテンプレートとして、配列表中の配列番号 15、16 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、アルデヒドデヒドロゲナーゼ様タンパク質をコードする ThcA 遺伝子 (Nagy et al., J. Bacteriol. 177 676-687 (1995)) のプロモーター配列 (図中においては ALDHp と表記) を含む DNA を得た。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を XbaI で消化して得られた 0.2kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら 2 つの PCR 断片を同時にプラスミド pGEM-3Zf (+) の XbaI、BamHI 部位にサブクローンした結果、ThcA 遺伝子のプロモーター配列のすぐ下流に TipA 遺伝子の ORF 並びに転写終結配列を含むプラスミドが作成され、pHN33 と名前を付けた。

次に pHN33 に存在する制限酵素 NcoI 認識部位 2カ所 (以下、NcoI (1)、NcoI (2) と表記する) を除去するため以下の作業をおこなった。

まず、プラスミド pHN33 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 9、17 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を XbaI で消化して得られた 0.5kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミド pHN33 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 18、12 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を KpnI で消化して得られた 0.6kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら 2 つの PCR 断片を同時にプラスミド pGEM-3Zf (+) の XbaI、KpnI 部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においては TipA 遺伝子の ORF 部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることな

く、NcoI (1) 認識部位が除去された。このプラスミドに pHN50 と名前を付けた。

次に pHN33 に存在する制限酵素認識部位 NcoI (2) を除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミド pHN33 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 9、19 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を XbaI で消化して得られた 0.8kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミド pHN33 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 20、12 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を KpnI で消化して得られた 0.3kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら 2 つの PCR 断片を同時にプラスミド pGEM-3Zf (+) の XbaI、KpnI 部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においては TipA 遺伝子の ORF 部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、NcoI (2) 認識部位が除去された。このプラスミドに pHN51 と名前を付けた。

最後に以下の作業を行った。pHN50 を XbaI と SacI で二重消化して得られた 0.7kb の DNA 断片と pHN51 を SacI と KpnI で二重消化した 0.4kb の断片を同時にプラスミド pGEM-3Zf (+) の XbaI、KpnI 部位にサブクローンした。結果、NcoI (1) と NcoI (2) 両方の制限酵素部位を欠いた TipA 遺伝子を持つプラスミドを取得し、これに pHN62 と名前をつけた。

〔実施例 5〕

ベクタープラスミド pHN153 の構築

目的のタンパク質を誘導的に発現せしめることができるかどうか確認するため、TipA 遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子として Thermoplasma acidophilum 由来のプロリンイミノペプチダーゼ (Tamura et al., FEBS Lett. 398 101-105 (1996) : 以下 PIP と略記する) をコードする遺伝子の ORF (図中においては PIP ORF と表記) を連結し、さらにその下流に転写のリードスルーを抑制するため転写終結配列を連結した。以下に具体的に述べる (図 4)。

実施例 4 にて精製した Streptomyces coelicolor A3 (2) 株のゲノム DNA をテン

プレートとして、配列表中の配列番号 2 1、 2 2 に記載のプライマーを用いて、 PCR による増幅を行った。その結果、 TipA 遺伝子のプロモーター配列（図中においては TipAp と表記）を含む 0.2kb の増幅された DNA を得た。なおこの PCR には プラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この断片を精製し、常法により 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した後、プラスミド pBluescript II SK (+) の SmaI 部位にサブクローンした（サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から KpnI 認識部位-TipA 遺伝子プロモーター配列-SacI 認識部位である）。このプラスミドに pHN150u と名前を付けた。

次に、プラスミド pRSET-PIP (Tamura et al., FEBS Lett. 398 101-105 (1996) : 以下 PIP と略記する) をテンプレートとして、配列表中の配列番号 2 3, 2 4 に記載のプライマーを用いて、 PCR による増幅を行った。なお、配列表中の配列番号 2 4 のプライマーは PIP 遺伝子の終止コドンを除いて、かつタンパク質の精製を容易にするために 6×His タグが PIP タンパク質の C 末端に付くように設計されている。6×His タグは、6 つの連続したヒスチジン残基から成る連続配列で、これを融合したタンパク質は、ニッケルイオン等に高い親和性を示すようになる。従って、ニッケルイオン等を用いた金属キレートクロマトグラフィーで精製が容易になる (Crowe et al., Methods Mol. Biol. 31 371-387 (1994))。この PIP 遺伝子を含む 0.9kb の DNA 断片を制限酵素 NcoI と SpeI で二重消化し、 pHN150u の NcoI、SpeI 部位にサブクローンした結果、 TipA 遺伝子のプロモーター配列のすぐ下流に PIP 遺伝子の ORF を含むプラスミドが作成され、 pHN151u と名前を付けた。

次に、実施例 4 にて精製した Rhodococcus erythropolis JCM3201 株のゲノム DNA をテンプレートとして、配列表中の配列番号 2 5, 2 6 に記載のプライマーを用いて、 PCR による増幅を行った。その結果、 ThcA 遺伝子の転写終結配列 (Nagy et al., J. Bacteriol. 177 676-687 (1995) : 図中においては ALDHt と表記) を含む DNA を得た。この 0.2kb の DNA 断片を制限酵素 SpeI と XbaI で二重消化し、 pHN151u の SpeI、XbaI 部位にサブクローンした。その結果、 TipA 遺伝子のプロモーター配列のすぐ下流に PIP 遺伝子の ORF を含み、またそのすぐ下流に ThcA 遺伝子の転写終結配列を含むプラスミドが作成され、 pHN153 と名前を付けた。

〔実施例 6 〕

ベクタープラスミド pHN169 の構築

Rhodococcus erythropolis をプラスミドで形質転換するためには適当な形質転換マーカーが必要になる。そこで Rhodococcus 属細菌内で機能する強力なプロモーターの下流に薬剤耐性遺伝子を連結し、使用することとした。プロモーターとしては、Streptomyces 属細菌由来の Elongation factor Tu をコードする Tuf1 遺伝子プロモーターを用いることとしたが、これは同プロモーターが強力に下流の遺伝子を転写せしめるとの報告があるからである (Wezel et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1219 543-547 (1994))。また、薬剤耐性遺伝子は入手が容易なテトラサイクリン耐性遺伝子を用いた。以下に具体的に述べる (図 5)。

実施例 4 にて精製した Streptomyces coelicolor A3 (2) 株のゲノム DNA をテンプレートとして、配列表中の配列番号 27、28 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、Tuf1 遺伝子のプロモーター配列 (図中においては Tuf1p と表記) を含む 0.2kb の増幅された DNA を得た。なおこの PCR にはプラチナ Pfx DNA ポリメラーゼを用いた。この断片を精製し、常法により 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した後、プラスミド pBluescript II SK (+) の HincII 部位にサブクローンした (サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から KpnI 認識部位-Tuf1 遺伝子プロモーター配列-EcoRI 認識部位である)。このプラスミドに pHN158 と名前を付けた。

次に、プラスミド pACYC184 (Rose, *Nucleic Acids Res.* 16 355 (1988)) をテンプレートとして、配列表中の配列番号 29、30 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、テトラサイクリン耐性遺伝子 (図中においては Tet^r と表記) を含む DNA を得た。この 1.3kb の DNA 断片を制限酵素 XhoI と SpeI で二重消化し、pHN158 の SalI、SpeI 部位にサブクローンした結果、Tuf1 遺伝子のプロモーター配列のすぐ下流にテトラサイクリン耐性遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN159 と名前を付けた。

次に pHN159 に存在する制限酵素認識部位 BamHI を除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミド pHN159 をテンプレートとして、配列表 31、32 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの DNA 断片は Pfu turbo DNA ポリメラーゼを用いたため、その末端は平滑末端である。この PCR 断片の片方の末端を XhoI で消化して得られた 0.5kb の DNA 断片を精製し、さらに常

法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミド pHN159 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 3 3、3 4 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR には Pfu turbo DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を NotI で消化して得られた 1.1kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら 2 つの PCR 断片を同時にプラスミド pBluescript II SK (+) の XhoI、NotI 部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においてはテトラサイクリン耐性遺伝子の ORF 部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、BamHI 部位が除去された。このプラスミドに pHN165 と名前を付けた。

次に pHN159 に存在する制限酵素認識部位 SalI を除去するため以下の作業をおこなった。まず、プラスミド pHN159 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 3 1、3 5 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR には Pfu turbo DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を XhoI で消化して得られた 0.8kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。一方、プラスミド pHN159 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 3 6、3 4 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。なおこの PCR には Pfu turbo DNA ポリメラーゼを用いた。この PCR 断片の片方の末端を NotI で消化して得られた 0.8kb の DNA 断片を精製し、さらに常法により平滑末端側の 5' 末端を T4-ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。これら 2 つの PCR 断片を同時にプラスミド pBluescript II SK (+) の XhoI、NotI 部位にサブクローンした結果、平滑末端同士で連結された部分においてはテトラサイクリン耐性遺伝子の ORF 部分であるが、コードされるアミノ酸が置換されることなく、SalI 認識部位が除去された。このプラスミドに pHN166 と名前を付けた。

最後に以下の作業を行った。pHN166 を SphI と SpeI で二重消化して得られた 0.9kb の DNA 断片を pHN165 の SphI、SpeI 部位にサブクローンした。結果、BamHI と SalI 両方の制限酵素認識部位を欠くテトラサイクリン耐性遺伝子クローンを取得し、このプラスミドに pHN169 と名前をつけた。

〔実施例 7〕

ベクタープラスミド pHN170、pHN171 の構築

実施例 2 から 6 までに分離してきた遺伝子群を連結し、Rhodococcus 属細菌内で誘導可能な発現ベクターを構築するために以下の作業を行った（図 6）。

pHN143 を SacI で消化して得られた 1.1kb の DNA 断片を pHN136 の SacI 部位にサブクローンした（サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から推定 RepB 遺伝子 0RF-tsr 遺伝子 0RF-アンピシリン耐性遺伝子 0RF である）。その結果できたプラスミドに pHN144 と名前をつけた。

次に、pHN62 を XbaI と KpnI で二重消化して得られた 1.1kb の DNA 断片を pHN144 の XbaI、KpnI 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pHN152 と名前をつけた。

次に、pHN153 を BsrGI と XbaI で二重消化して得られた 1.2kb の DNA 断片を pHN152 の BsrGI、SpeI 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pHN154 と名前をつけた。

次に、pHN169 を XbaI と SpeI で二重消化して得られた 1.6kb の DNA 断片を pHN154 の XbaI 部位にサブクローンした（サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から tsr 遺伝子 0RF-テトラサイクリン耐性遺伝子 0RF-ThcA 遺伝子プロモーター配列である）。その結果 TipA 遺伝子プロモーターの制御下に置かれた PIP 遺伝子を含むプラスミドが作成され、できたプラスミドに pHN170 と名前をつけた。

また組み換えタンパク質の高発現化のため、TipA 遺伝子プロモータ下流のリボソーム結合部位を翻訳効率の良いとされるラムダファージ gene10 由来の配列（Gold and Stormo, Methods Enzymol. 185 89-93 (1990)）に変化させた（図 6）。以下に具体的に述べる。

プラスミド pHN170 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 21, 37 に記載のプライマーを用いて、PCR による增幅を行った。その結果、TipA 遺伝子プロモーターとラムダファージ gene10 由来リボソーム結合部位からなるハイブリッドプロモーター（以下 TipA-LG10 プロモーターと表記する：図中に置いては TipA-LG10p と表記）を得た。この 0.2kb の DNA 断片を制限酵素 BsrGI と NcoI で二重消化し、pHN170 の BsrGI、NcoI 部位にサブクローンした。その結果 TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた PIP 遺伝子を含むプラスミドが作成され、できたプラスミドに pHN171 と名前をつけた。図 22 に TipA プロモーター配列を、図

23にTipAプロモーターのTipA-LG10プロモーターへの改変のためのリボソーム結合部位(RBS)配列の改良を示す。

〔実施例8〕

ベクタープラスミド pTip-NH1、pTip-CH1、pTip-LNH1、pTip-LCH1 の構築

実施例7で述べたプラスミドからレポーターであるPIP遺伝子を除き、マルチクローニング部位を導入するため以下の作業を行った(図7)。

配列表中の配列番号38、39に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチドはマルチクローニング部位になる配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ。これら2つを等モル量ずつ混合し、70°Cで10分処理し、20分かけて室温に冷却し、2本鎖化させた。その結果、その末端はNcoIとSpeIで二重消化されたベクターと連結可能な状態になり、この2本鎖化した合成DNA(図中においてはMCS Linker NNcoと表記)をpHN170のNcoI、SpeI部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドにpTip-NH1と名前をつけた。また、配列表中の配列番号40、41に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチド(マルチクローニング部位になる配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ)を同様に2本鎖化させた合成DNA(図中においてはMCS Linker CNcoと表記)をpHN170のNcoI、SpeI部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドにpTip-CH1と名前をつけた。

実施例7で述べたTipA遺伝子プロモーター配列とラムダファージgene10由来リボソーム結合部位からなるハイブリッドDNAを制限酵素BsrGIとNcoIで二重消化し、pTip-NH1とpTip-CH1のBsrGI、NcoI部位にそれぞれサブクローンした。結果得られたプラスミドにpTip-LNH1、pTip-LCH1とそれぞれ名前を付けた。

〔実施例9〕

ベクタープラスミド pTip-NH2、pTip-CH2、pTip-LNH2、pTip-LCH2 の構築

実施例8で述べたプラスミド pTip-NH1、pTip-CH1、pTip-LNH1、pTip-LCH1において、マルチクローニング部位の最も上流のNcoI部位をNdeIに変更するため以下の作業を行った(図8)。

プラスミドpHN170をテンプレートとして、配列表中の配列番号21、42に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、TipA遺伝子プロモーターを含むDNAを得た。この0.2kbのDNA断片を制限酵素BsrGIとNdeIで二重消化し、pHN170のBsrGI、NdeI部位にサブクローンした。結果得られたプラス

ミドに pHN183 と名前を付けた。

配列表中の配列番号 4 3、4 4 に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチドはマルチクローニング部位になる配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ。これら 2 つを等モル量ずつ混合し、70°C で 10 分処理し、20 分かけて室温に冷却し、2 本鎖化させた。その結果、その末端は NdeI と SpeI で二重消化されたベクターと連結可能な状態になり、この 2 本鎖化した合成 DNA (図中においては MCS Linker NNde と表記) を pHN183 の NdeI、SpeI 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pTip-NH2 と名前を付けた。また、配列表中の配列番号 4 5、4 6 に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチド (マルチクローニング部位になる配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ) を同様に 2 本鎖化させた合成 DNA (図中においては MCS Linker CNde と表記) を pHN183 の NdeI、SpeI 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pTip-CH2 と名前を付けた。

プラスミド pTip-LNH1 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 2 1、4 7 に記載のプライマーを用いて、PCR による增幅を行った。その結果、TipA 遺伝子プロモーターとラムダファージ gene10 由来リボソーム結合部位からなるハイブリッド DNA を得た。この 0.2kb の DNA 断片を制限酵素 BsrGI と NdeI で二重消化し、pTip-NH2 と pTip-CH2 の BsrGI、NdeI 部位にそれぞれサブクローンした。結果得られたプラスミドに pTip-LNH2、pTip-LCH2 とそれぞれ名前を付けた。

実施例 8、9 で作成したプラスミドのマップと、マルチクローニング部位周辺の配列をまとめて図 9 に示す。該図中、実線の矢印は TipA 遺伝子プロモーター中に存在する Inverted repeat 配列を示す。斜線の矢印は ThcA 遺伝子転写終結配列に存在する Inverted repeat 配列を示す。また、原核生物のプロモーター領域に一般的に存在し、遺伝子の転写に重要な -10 領域、-35 領域、RBS は四角で囲んである。また RBS の中でも最も重要な SD 配列 (Shine and Dalgarno, Eur. J. Biochem. 57 221-230 (1975)) は下線を引いてある。図 9 a 中のチオストレプトン誘導システムは、Thio^r、ALDH_p、TipA、TipAp、TipA-LG10p および ALDH_t を含む。Thio^r は、R. erythropolis にチオストレプトン耐性を付与する。また、ALDH_p は TipA タンパク質を構成的に産生するプロモーターを示し、TipA は TipA タンパク質をコードする。また、TipAp は TipA プロモーターを示し、TipA-LG10p は改良 TipA プロモーターを示し、ALDH_t は転写終結配列を示す。さらに、プラスミドの自律複製に

必須な領域として、ColE1 および RepA&B を含む。ColE1 は大腸菌用であり、RepA&B は R. erythropolis 用である。さらに、抗生物質耐性マーカーとして Tuf1p-Tet^r および Amp^r を含む。Tuf1p-Tet^r は R. erythropolis 用形質転換マーカーであり、Amp^r は大腸菌用形質転換マーカーである。

〔実施例 10〕

ベクタープラスミド pTip-CH1.1、pTip-CH2.1、pTip-LCH1.1、pTip-LCH2.1 の構築
実施例 8 及び 9 で述べたプラスミド pTip-CH1、pTip-CH2、pTip-LCH1、pTip-LCH2 において、マルチクローニング部位の XhoI 部位以降の読み枠を市販の pET ベクター (Novagen 社) の読み枠と一致させるために以下の作業を行った (図 10)。

プラスミド pTip-CH1 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 21、104 に記載のプライマーを用いて、PCR による增幅を行った。その結果、TipA 遺伝子プロモーターとマルチクローニング部位を含む DNA を得た。この 0.3kb の DNA 断片を制限酵素 BsrGI と SpeI で二重消化し、pTip-CH1 の BsrGI、SpeI 部位にサブクローンした。結果得られたプラスミドに pTip-CH1.1 と名前を付けた。

プラスミド pTip-CH2 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 21、104 に記載のプライマーを用いて、PCR による增幅を行った。その結果、TipA 遺伝子プロモーターとマルチクローニング部位を含む DNA を得た。この 0.3kb の DNA 断片を制限酵素 BsrGI と SpeI で二重消化し、pTip-CH1 の BsrGI、SpeI 部位にサブクローンした。結果得られたプラスミドに pTip-CH2.1 と名前を付けた。

プラスミド pTip-LCH1 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 21、104 に記載のプライマーを用いて、PCR による增幅を行った。その結果、TipA-LG10 プロモーターとマルチクローニング部位を含む DNA を得た。この 0.3kb の DNA 断片を制限酵素 BsrGI と SpeI で二重消化し、pTip-CH1 の BsrGI、SpeI 部位にサブクローンした。結果得られたプラスミドに pTip-LCH1.1 と名前を付けた。

プラスミド pTip-LCH2 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 21、104 に記載のプライマーを用いて、PCR による增幅を行った。その結果、TipA-LG10 プロモーターとマルチクローニング部位を含む DNA を得た。この 0.3kb の DNA 断片を制限酵素 BsrGI と SpeI で二重消化し、pTip-CH1 の BsrGI、SpeI 部位にサブクローンした。結果得られたプラスミドに pTip-LCH2.1 と名前を付けた。

〔実施例 11〕

ベクタープラスミド pHN172、pHN173 の構築

発現の誘導が厳密に調節されているかを調べるために以下のようなコントロール実験用プラスミドを作成した（図 1-1）。

pHN169 を XbaI と SpeI で二重消化して得られた 1.6kb の DNA 断片を pHN144 の XbaI 部位にサブクローンした（サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から tsr 遺伝子 ORF-テトラサイクリン耐性遺伝子 ORF-アンピシリン耐性遺伝子 ORF である）。その結果できたプラスミドに pHN172 と名前をつけた。

次に、pHN153 を BsrGI と XbaI で二重消化して得られた 1.2kb の DNA 断片を pHN144 の BsrGI、SpeI 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pHN164 と名前をつけた。次いで、pHN169 を XbaI と SpeI で二重消化して得られた 1.6kb の DNA 断片を pHN164 の XbaI 部位にサブクローンした（サブクローンされた向きは DNA の 5' 方向から tsr 遺伝子 ORF-テトラサイクリン耐性遺伝子 ORF-アンピシリン耐性遺伝子 ORF である）。その結果できたプラスミドに pHN173 と名前をつけた。

pHN170 は、TipA 遺伝子プロモーター、その下流に PIP ORF、さらにその下流に ThcA 遺伝子転写終結配列、の 3 因子が連結された遺伝子カセット（以下 Expression cassette と表記）と、ThcA 遺伝子プロモーター、その下流に TipA 遺伝子、の 2 因子が連結された遺伝子カセット（以下 Inducer cassette と表記）両方をもつ。pHN173 は Expression cassette のみをもち、pHN172 は両 cassette を持たない。

〔実施例 1-2〕

Rhodococcus 属細菌の形質転換

Rhodococcus erythropolis JCM3201 株を LB 培地 100ml にて対数増殖期に至るまで 30℃で振とう培養する。培養液を 30 分間氷冷し、遠心分離し、菌体を回収する。これに 100ml の氷冷滅菌水を加え、よく攪拌し、再び遠心分離し、菌体を回収する。これに 100ml の氷冷 10%グリセリン溶液を加え、よく攪拌し、遠心分離し、菌体を回収する。この氷冷 10%グリセリン溶液での洗浄をもう一度繰り返し、菌体を 5ml の氷冷 10%グリセリン溶液に懸濁する。400μl ずつ分注し、液体窒素で瞬間冷凍し、使用するまで-80℃にて保存した。-80℃から菌体を取り出し、氷上にて融解し、プラスミド pHN170、または pHN172、または pHN173 を 3μl (そ

それぞれ約 300ng) 加えた。この菌体と DNA の混合液をエレクトロポレーションキュベット (Bio-Rad 社:0.2cm ギャップキュベット) に移し、同社の遺伝子導入装置ジーンパルサーII を用いて、電場強度 12.5kV/cm で、パルスコントローラーの設定はキャパシタンス 25μF、外部抵抗 400Ω にてそれぞれ電気パルスを与えた。電気パルス処理した菌体と DNA の混合液を 1ml の LB 培地に混合し、30°C にて 4 時間培養した後集菌し、20μg/ml テトラサイクリン入り LB 寒天培地(寒天は濃度 1.8%) に塗布し、30°C にて 3 日培養し、それぞれの形質転換体を得た。

〔実施例 1 3〕

Rhodococcus 属細菌における PIP 活性の測定 1

構築された発現ベクターにはレポーター遺伝子として PIP 遺伝子が組み込まれており、チオストレプトンによる誘導性、誘導の強さなどを、PIP の酵素活性を測定することで、確認することができる。菌体中に存在する PIP の量は人工基質 H-Pro-βNA (Bachem 社製) を加水分解する活性を調べることで容易に定量が可能である。

実施例 1 2 にて作成した Rhodococcus erythropolis JCM3201 株の形質転換体を 8μg/ml のテトラサイクリンを含む LB 培地で 30°C にて培養し、600nm の波長で測定したオプティカルデンシティー (O. D. 600) が 0.6 になった時点で、終濃度 1μg/ml になるようにチオストレプトン(溶媒はジメチルスルホオキサイド)を加え、PIP の発現を誘導させた。

16 時間後に培養液の一部を取り出し、8μg/ml のテトラサイクリンを含む LB 培地で 200μl にメスアップし、60°C にて 1 分加温する。そこに PIP の基質として 2μl の H-Pro-βNA (100mM: 溶媒はジメチルスルホオキサイド) を加え 60°C にて 20 分インキュベートする (PIP は 60°C が至適温度)。PIP よって H-Pro-βNA から加水分解されて遊離した βNA を観察するために、発色剤として 134μl の Fast Garnet GBC Salt 溶液 (和光純薬社製で濃度 0.5mg/ml : 1M 酢酸ナトリウムバッファー (pH4.2)、10% Triton X-100 が溶媒) を加える。PIP が発現していないければ上記混合液は黄色を呈するが、発現していれば赤色を呈する。また、呈色した赤色を吸光分光光度計を用い、550nm での吸光度 (A550) を測定し、PIP 活性を定量した。測定は FastGarnet GBC Salt を加えた後、滅菌水 666μl を加え希釈して行った。

その際、550nm では細胞のオプティカルデンシティーも測定してしまうので、550nm での細胞のオプティカルデンシティー (O. D. 550) は別測定し、測定時に使用した O. D. 550 に相当する値を A550 の値から差し引いて補正した値を Ac550 とする。すなわち、 $Ac550 = A550 - O. D. 550 \times PIP$ の活性測定に使用した培養液量 (ml) で計算される。ユニット値は「20 分間の測定で得られる、培養液 1ml あたり、O. D. 600=1 あたりの Ac550 の値」とし、「 $Ac550 \div PIP$ の活性測定に使った培養液量 (ml) \div O. D. 600」で計算した。

pHN170 で形質転換した細胞において、チオストレプトンを加えずに培養した場合は黄色を呈したが、加えた場合赤色を呈した。pHN172、pHN173 で形質転換した細胞においては、チオストレプトンの有無に関わらず、黄色を呈した。

実施例 1 2 にて作成した Rhodococcus erythropolis JCM3201 株の形質転換体を 8 μ g/ml のテトラサイクリンを含む LB 培地で 30°C にて培養し、O. D. 600 が 2.0 になったら、直ちに 4°C に温度を下げ、菌体を馴化させるために、1 時間振とう培養した。そこに終濃度 1 μ g/ml になるようにチオストレプトンを加え、PIP の発現を誘導させた。40 時間後に培養液の一部を取り出し、上記 30°C と同様の実験を行った。

pHN170 で形質転換した細胞において、チオストレプトンを加えずに培養した場合は黄色を呈したが、加えた場合赤色を呈した。pHN172、pHN173 で形質転換した細胞においては、チオストレプトンの有無に関わらず、黄色を呈した。

以上の結果をまとめて図 1 2 に示す。

図 1 2 に示すように Rhodococcus erythropolis JCM3201 株を pHN170、pHN172、pHN173 で形質転換し、30°C、4°C で PIP を発現させた時と発現させない時、それぞれの PIP 活性を測定した。図 1 2 には終濃度 1 μ g/ml のチオストレプトンを加えたか否か (+ または -)、活性値、培養温度、活性測定に使用した培養液量、形質転換したプラスミド、プラスミドの持つ「Cassette」の有無 (+ または -) が示されている。

この結果から、広範な温度域において、チオストレプトンによって誘導可能な発現ベクターが構築されたことが確認された。

[実施例 1 4]

Rhodococcus 属細菌における PIP 活性の測定 2

実施例 1 2 にて作成した Rhodococcus erythropolis JCM3201 株を pHN170、pHN171 で形質転換体した細胞の PIP 活性を実施例 1 3 に準じて測定した。

図 1 3 に終濃度 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のチオストレプトンを加えてから時間を追って PIP 活性を測定した結果を示す。該図は Rhodococcus erythropolis JCM3201 株を pHN170 で形質転換し、30°C、4°C で PIP を発現させた時の活性を時間を追って測定したものと示す。図 1 3 中、縦軸は PIP の活性値（ユニット）、横軸は終濃度 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のチオストレプトンを加えてからの時間（分）を示す。4°C の「○」は O. D. 600 が 1.0 の時に発現誘導開始させた時、「□」は O. D. 600 が 2.0 の時に発現誘導開始させた時の活性を示す。30°C の「○」は O. D. 600 が 0.6 の時に発現誘導開始させた時、「□」は O. D. 600 が 1.0 の時に発現誘導開始させた時の活性を示す。

また、図 1 4 に加えるチオストレプトンの終濃度を変化させて測定した結果を示すが、発現誘導時間は 4°C が O. D. 600=2.0 で誘導開始し、2400 分（40 時間）で、30°C が O. D. 600=0.6 で誘導開始し、960 分（16 時間）である。図 1 4 に示す実施例においては、Rhodococcus erythropolis JCM3201 株を pHN170 で形質転換し、30°C、4°C で PIP を発現させた時の活性を加えるチオストレプトンの濃度を変えて測定したものと示す。図 1 4 中、縦軸は PIP の活性値（ユニット）、横軸は培地中に添加したチオストレプトンの終濃度（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を示す。

この結果から、発現誘導には 30°C でも 4°C でも、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のチオストレプトンで十分なことが判明した。また、発現誘導の時期によるが、30°C の場合は 500 から 1000 分（約 8-16 時間）程度、4°C の場合は 3000 分（50 時間）からそれ以上で細胞あたりの PIP の発現量は最大に達することが示された。

〔実施例 1 5〕

Rhodococcus 属細菌における PIP 活性の測定 3

Rhodococcus erythropolis JCM3201 株、Rhodococcus fascians JCM10002 株、Rhodococcus opacus DSM44193 株において実施例 1 2 と同様に pHN170 による形質転換を行った。その結果、pHN170 によって Rhodococcus erythropolis のみならず、Rhodococcus fascians、Rhodococcus opacus をも形質転換することができた。従って、pHN170 中に導入された、Rhodococcus erythropolis JCM2895 株由来の自律複製起点は Rhodococcus fascians、Rhodococcus opacus においても機能することが示された。また、これらの形質転換体を用いて、実施例 1 3 に準じて PIP 活

性を測定した。なお、いずれの菌株においても、発現誘導時間は4℃がO.D.600=2.0で誘導開始し、2400分(40時間)で、30℃がO.D.600=0.6で誘導開始し、960分(16時間)である。結果を図15に示す。図15には、Rhodococcus erythropolis JCM3201株、Rhodococcus fascians JCM10002株、Rhodococcus opacus DSM44193株をpHN170で形質転換し、30℃、4℃でPIPを発現させた時と発現させない時、それぞれのPIP活性を測定した。図には終濃度1μg/mlのチオストレプトンを加えたか否か(+または-)、活性値、培養温度、活性測定に使用した培養液量、pHN170で形質転換された宿主、が示されている。

pHN170で形質転換されたすべてのRhodococcus属細菌において、チオストレプトンを加えずに培養した場合は黄色を呈したが、加えた場合赤色を呈した。しかし、Rhodococcus fascians JCM10002株、Rhodococcus opacus DSM44193株においてはRhodococcus erythropolis JCM3201株に比べて発現は低かった。

[実施例16]

Rhodococcus属細菌における外来タンパク質の発現と精製1

pHN170(実施例7に記載)、pHN171(実施例7に記載)を用いて、実施例12と同様にRhodococcus erythropolis JCM3201株を形質転換し、実施例13に準じてPIPを30℃、4℃でそれぞれ発現させた。ここでは、終濃度1μg/mlのチオストレプトンを加えた後、時間を追って菌体を回収し、PIPの精製を行った。PIPのC末端には6×Hisタグがついており、Ni-NTA Superflow(Qiagen社製)を用いて、その使用説明書に準じて精製を行った。

以下に具体的な精製法を示すが、精製の作業は4℃で行った。タンパク質を発現させた菌体(20ml培養液分)を回収し、1mlのNT-Buffer(50mM Tris-HCl(pH8.0)、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール)に懸濁し、1gのガラスピーズ(直径0.105-0.125ミリメートル)を加えた。これをFast-prep FP120(SAVANT社製)にて6m/秒の速度、20秒間往復振とうさせることで、細胞を破壊した。20,000×gにて遠心し、その上清700μlに、予めNT-Bufferで平衡化されたNi-NTA Superflowをベッド体積40μlになるように加えた。これを1時間回転攪拌しながらNi-NTA Superflowビーズと6×Hisタグのついたタンパク質とを結合させた。このビーズをNT-Bufferで4回洗浄した後、120μlのNTE-Buffer(50mM Tris-HCl(pH7.0)、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、400mMイ

ミダゾール)に3回懸濁することで、ビーズから6×Hisタグのついたタンパク質を溶出させた。

上記サンプルのうち10μlを常法に従い、12%SDSポリアクリルアミド電気泳動に供した結果を図16に示す。Rhodococcus erythropolis JCM3201株をpHN170(TipA遺伝子プロモーターからの発現:左2枚の図)、pHN171(TipA-LG10プロモーターからの発現:右2枚の図)で形質転換し、4°C(上2枚の図)、30°C(下2枚の図)でPIPを発現させた。終濃度1μg/mlのチオストレプトンを加えてから、時間を追って菌体を回収し、PIPのC末端につけられた6×Hisタグを利用してNi-NTA Superflowを用いて精製した。菌体を回収した時間は4°Cにおいては、0分(一番左のレーン)、180分(左から2番目のレーン)、420分(左から3番目のレーン)、1080分(左から4番目のレーン)、1440分(左から5番目のレーン)、1860分(左から6番目のレーン)、2520分(左から7番目のレーン)、3060分(左から8番目のレーン)で、30°Cにおいては、0分(1番左のレーン)、120分(左から2番目のレーン)、240分(左から3番目のレーン)、420分(左から4番目のレーン)、540分(左から5番目のレーン)、720分(左から6番目のレーン)、900分(左から7番目のレーン)、1440分(左から8番目のレーン)である。図16の各図中、一番右のレーンは誘導せずに(すなわちチオストレプトンを加えずに)培養を続けた菌体から精製したサンプルを示す。30°Cにおいては、TipA遺伝子プロモーターからの発現に比べるとTipA-LG10プロモーターからの発現は若干低かったが、4°Cにおいては、逆にTipA-LG10プロモーターからの発現の方が高かった。また、TipA-LG10プロモーターにおいても発現の誘導は厳密にコントロールされていた。

両プロモーターからの発現量の詳細な比較は実施例18に詳しく述べる。

[実施例17]

Rhodococcus属細菌における外来タンパク質の発現と精製2

pHN170(実施例7に記載)、pHN171(実施例7に記載)を用いて、実施例12と同様にRhodococcus erythropolis JCM3201株を形質転換し、実施例13に準じてPIPを32°C、30°C、15°C、4°Cでそれぞれ発現させた。なお、発現誘導時間は4°CがO.D.600=2.0で誘導開始し、2400分(40時間)で、15°CがO.D.600=1.0で誘導開始し、1500分(25時間)で、30°CがO.D.600=0.6で誘導開始し、960分(16時

間)で、32°CがO.D. 600=0.6で誘導開始し、960分(16時間)である。加えたチオストレプトンは終濃度1μg/mlである。精製は実施例1-6と同様に行った。

上記サンプルのうち10μlを常法に従い、12%SDSポリアクリルアミド電気泳動に供した結果を図17に示す。Rhodococcus erythropolis JCM3201株をpHN170(TipA遺伝子プロモーターからの発現:レーン1,3,5,7)、pHN171(TipA-LG10プロモーターからの発現:レーン2,4,6,8)で形質転換し、4°C(レーン7,8)、15°C(レーン5,6)、30°C(レーン3,4)、32°C(レーン1,2)、でPIPを発現させた。PIPのC末端につけられた6×Hisタグを利用してNi-NTA Superflowを用いて精製した。

32°Cから4°Cの広範な温度域において、TipA遺伝子プロモーター、並びにTipA-LG10プロモーターからのPIPの発現が確認された。32°C、30°CにおいてはTipAプロモーターからのPIPの発現量の方が多かったが、15°C、4°CにおいてはTipA-LG10プロモーターからの発現の方が多かった。

[実施例1-8]

Rhodococcus属細菌における外来タンパク質の発現と精製3

PIP以外のタンパク質も該発現ベクターを用いて、発現させることができるかどうか調べるために、以下の実験を行った。

プラスミドpRSET-ATPIPをテンプレートとして、配列表中の配列番号4-8、4-9に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、Arabidopsis thaliana由来PIP遺伝子(Tamura et al., FEBS Lett. 398 101-105 (1996) :以下AtPIPと略記)を含むDNAを得た。この1.0kbのDNA断片を制限酵素NcoIとXhoIで二重消化し、pTip-CH1、並びにpTip-LCH1のNcoI、XhoI部位にそれぞれサブクローンした結果、TipA遺伝子プロモーターもしくはTipA-LG10プロモーターの制御下に置かれたAtPIP遺伝子(6×HisタグをC末端に持つ)を含むプラスミドが作成され、pHN176、pHN177とそれぞれ名前を付けた。

プラスミドpTrc99a-GFPをテンプレートとして、配列表中の配列番号5-0、5-1に記載のプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、Aequorea victoria由来蛍光緑色タンパク質をコードする遺伝子(以下GFPと略記)を含むDNAを得た。0.8kbのDNA断片を制限酵素BspHIとSmaIで二重消化し、pTip-NH1並びにpTip-LNH1のNcoI、SnaBI部位にそれぞれサブクローンした結果、TipA遺

伝子プロモーターもしくは TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた GFP (6×His タグを N 末端に持つ) 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN187、pHN186 とそれぞれ名前を付けた。

プラスミド pGEX-2T (アマシャムバイオサイエンス社) をテンプレートとして、配列表中の配列番号 52、53 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、グルタチオン-S-トランスフェラーゼタンパク質をコードする遺伝子 (以下 GST と略記) を含む DNA を得た。0.7kb の DNA 断片を制限酵素 NcoI と XhoI で二重消化し、pTip-NH2、並びに pTip-LNH2 の NcoI、XhoI 部位にそれぞれサブクローンした結果、TipA 遺伝子プロモーターもしくは TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた GST 遺伝子 (6×His タグを N 末端に持つ) を含むプラスミドが作成され、pHN282、pHN283 とそれぞれ名前を付けた。

pHN170 (実施例 7 に記載)、pHN171 (実施例 7 に記載)、pHN176、pHN177、pHN187、pHN186、pHN282、pHN283 を用いて、実施例 1 2 と同様に Rhodococcus erythropolis JCM3201 株を形質転換し、実施例 1 3 に準じて PIP、AtPIP、GFP、GST 各タンパク質を 30°C、4°C でそれぞれ発現させた。いずれも、発現誘導時間は 4°C が O. D. 600=2.0 で誘導開始し、2400 分 (40 時間) で、30°C が O. D. 600=0.6 で誘導開始し、960 分 (16 時間) で、加えたチオストレプトンは終濃度 1 μg/ml である。なお、4°C では 50ml、30°C では 20ml の培養液から精製を行った。

上記 4 種のタンパク質には全て 6×His タグがついており、実施例 1 6 に準じて精製を行った。

上記サンプルのうち 10 μl を常法に従い、12% SDS ポリアクリルアミド電気泳動に供した結果を図 1 8 に示す。Rhodococcus erythropolis JCM3201 株を pHN170 (TipA 遺伝子プロモーターの下流に PIP : レーン 1、9)、pHN171 (TipA-LG10 プロモーターの下流に PIP : レーン 2、10)、pHN176 (TipA 遺伝子プロモーターの下流に AtPIP : レーン 3、11)、pHN177 (TipA-LG10 プロモーターの下流に AtPIP : レーン 4、12)、pHN187 (TipA 遺伝子プロモーターの下流に GFP : レーン 5、13)、pHN186 (TipA-LG10 プロモーターの下流に GFP : レーン 6、14)、pHN282 (TipA 遺伝子プロモーターの下流に GST : レーン 7、15)、pHN283 (TipA-LG10 プロモーターの下流に GST : レーン 8、16) で形質転換し、4°C (レーン 9 から 16) 30°C (レーン 1 から 8) で各タンパク質を発現させた。各タンパク質の末端につけられた 6×His

タグを利用して Ni-NTA Superflow を用いて精製した。

また、デンシトメーターにてバンドの密度を測定し、定量した結果を図 1 9 に示すが、これは図 1 8 で示された SDS ポリアクリルアミド電気泳動像のバンドから定量したものである。該図では、それぞれの外来タンパク質が 1 リットルの培養液からどれだけ精製されたかを示す。単位は mg で示されている。一番右のカラム（倍率）は、TipA 遺伝子プロモーターを用いて発現させた場合に比べて、TipA-LG10 プロモーターを用いて発現させた場合、何倍のタンパク質が精製されるか示されている。この結果、4°Cにおいて、TipA 遺伝子プロモーターよりも TipA-LG10 プロモーターから発現させる方が、得られる組み換えタンパク質の量が多いことがわかった。しかし、30°Cの場合は必ずしも TipA-LG10 プロモーターから発現させる方が、得られる組み換えタンパク質の量が多いとは限らなかった。

〔実施例 1 9 〕

大腸菌に対して 30°C で増殖阻害効果を示すマウス由来タンパク質の分離

具体的にどの遺伝子が発現されると宿主に対して増殖阻害効果を示すのかを調べるために、マウス肝臓由来の Poly (A)⁺RNA (STRATAGENE 社製) を用いて大腸菌用発現ライブラリーを構築した。以下に具体的に述べる。

大腸菌用発現ベクターはアラビノース誘導性ベクターを用いることとした。まず該ベクター、pBAD/HisA (Invitrogen 社製) において、cDNA の導入を容易にするために、マルチクローニング部位を改変した pBAD-Linker を作成した。以下にその作成過程を述べる。配列表中の配列番号 5 4、5 5 に記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチド (EcoRI、BglIII、XhoI 認識部位からなるクローニング配列を含み、お互いに相補的な配列を持つ) を等モル量ずつ混合し、70°Cで 10 分処理し、20 分かけて室温に冷却し、2 本鎖化させた。結果、その末端は NcoI と HindIII で二重消化されたベクターと連結可能な状態になり、これを pBAD/HisA の NcoI、HindIII 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pBAD-Linker と名前をついた。

STRATAGENE 社製 cDNA synthesis kit を用い、その使用説明書に従って、上記 Poly (A)⁺RNA より 2 本鎖 cDNA を合成した。次いで、この cDNA を pBAD-Linker の EcoRI、XhoI 部位にライゲーションした。このライゲーション産物を常法に従い、

大腸菌 TOP10 (Invitrogen 社製) に形質転換し、50 μg/ml アンピシリン入り LB 寒天培地上にて、5 万個の形質転換体を得た。その寒天培地のレプリカを 50 μg/ml アンピシリンと 0.2% L-アラビノースを含んだ LB 寒天培地に GenHunter 社製 Easy Transfer Replica Plating Device を用いて作成し、タンパク質の発現を誘導させ、30°Cにて一晩インキュベートした。その結果、アラビノースを含まない培地上では生育できるが、アラビノースを含む培地上では生育できないコロニーが 426 個選別された。

この 426 個の TOP10 形質転換体を 1.5ml の 50 μg/ml アンピシリン入り LB 培地にて培養した後、常法に従いプラスミドを分離、精製した。得られたプラスミドは制限酵素 EcoRI、XbaI の二重消化後、1%アガロース電気泳動に供し、マウス由来の cDNA 断片の長さを見積もった。さらに、得られたプラスミドは配列表中の配列番号 5 6 記載の合成オリゴデオキシリボヌクレオチド用い、DNA シークエンサー ABI PRISM (R) 3100 Genetic Analyzer にて、マウス由来 cDNA 部分の塩基配列を約 500 塩基決定した。その結果を図 20 に示す。該図は BLAST プログラムを用いて、決定された DNA 配列を元に相同性検索を行い、遺伝子を同定した結果を示す。

〔実施例 20〕

Rhodococcus 属細菌、並びに大腸菌における外来タンパク質の発現と精製

実施例 19 にて分離した遺伝子のうち、Serum amyloid A (Saa1)、NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex 4、Cytochrome b5 like、RIKEN1500015G18、Transferrin、Apolipoprotein A-V、Pantotenate kinase 1β、Peroxiredoxin 4、RIKEN1300017J02 (Transferrin Homolog) を Rhodococcus erythropolis JCM3201 と大腸菌 TOP10 を宿主として発現させた。また、以下の 4 群、10 種類のタンパク質も同様に発現させた。1 群) 大腸菌で発現させると不活性な封入体となることが知られている 3 種類のプロテアーゼ、Cathepsin D、Prothrombin、Kallikrein 6、2 群) その生理活性から大腸菌での発現が困難だと予想される 2 種類の DNase、LSDNAse、DLAD、3 群) 他のグループの研究で、その細胞増殖阻害活性により大腸菌での発現が困難だとされているもの、HMG-1、Kid1、Bax alpha、4 群) 他のグループの研究で、低温依存的に可溶化されるとされているもの、Glucokinase、p37A。なお、Rhodococcus erythropolis においては 30°C と 4°C で、大腸菌は 30°C

で組み換えタンパク質をそれぞれ発現させた。以下に詳しく述べる。

プラスミド LE20 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 57、58 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Serum Amyloid Protein A タンパク質 (Meeker et al., Proteins 30 381-387 (1998)) をコードする Saa1 遺伝子 (GenBank 受入番号 M11131) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NdeI と XhoI で二重消化し、pTip-LNH1 の NdeI、XhoI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた Saa1 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN205 と名前を付けた。また、プラスミド LE20 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 59、60 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Saa1 遺伝子を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 XhoI と KpnI で二重消化し、pBAD/HisA の XhoI、KpnI 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた Saa1 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN193 と名前を付けた。

プラスミド L113 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 61、62 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex 4 をコードする遺伝子 (Walker et al., J. Mol. Biol. 226 1051-1072 (1992) : GenBank 受入番号 BC011114 : 以下 NADH4 と略記) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NdeI と EcoRI で二重消化し、pTip-LNH1 の NdeI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた NADH4 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN206 と名前を付けた。また、プラスミド L113 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 63、62 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 NADH4 遺伝子を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 XhoI と EcoRI で二重消化し、pBAD/HisA の XhoI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた NADH 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN195 と名前を付けた。

プラスミド L3 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 64、65 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Cytochrome b5 like タンパク質をコードする遺伝子 (GenBank 受入番号 AK002426 : 以下 Cytochrome b51 と略記) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NdeI と EcoRI

で二重消化し、pTip-LNH1 の NdeI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた Cytochrome b51 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN208 と名前を付けた。また、プラスミド L3 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 6 6、6 5 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Cytochrome b51 遺伝子を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 XhoI と EcoRI で二重消化し、pBAD/HisA の XhoI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた Cytochrome b51 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN199 と名前を付けた。

プラスミド LE123 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 6 7、6 8 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来機能不明な推定上のタンパク質をコードする遺伝子 (GenBank 受入番号 NM#025439: 以下 LE123 と略記) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NdeI と EcoRI で二重消化し、pTip-LNH1 の NdeI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた LE123 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN287 と名前を付けた。また、プラスミド LE123 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 6 9、6 8 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 LE123 遺伝子を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 XhoI と EcoRI で二重消化し、pBAD/HisA の XhoI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた LE123 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN276 と名前を付けた。

プラスミド LE280 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 7 0、7 1 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Transferrin をコードする遺伝子 (Mason et al., Protein Expr. Purif. 23: 142-150 (2001); GenBank 受入番号 BC022986) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NdeI と HindIII で二重消化し、pTip-LNH1 の NdeI、HindIII で部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた Transferrin 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN289 と名前を付けた。また、プラスミド LE280 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 7 2、7 1 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Transferrin 遺伝子を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 XhoI と HindIII で二重消化し、pBAD/HisA

の XbaI、HindIII 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた Transferrin 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN277 と名前を付けた。

プラスミド LE295 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 7 3、7 4 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Apolipoprotein A-V をコードする遺伝子 (van der Vliet et al., J. Biol. Chem. 276 44512-44520 (2001) : GenBank 受入番号 NM#080434:以下 Apoa5 と略記) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NcoI と EcoRI で二重消化し、pTip-LNH2 の NcoI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた Apoa5 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN288 と名前を付けた。また、プラスミド LE295 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 7 5、7 4 に記載のプライマーを用いて、PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Apoa5 遺伝子を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 XbaI と EcoRI で二重消化し、pBAD/HisA の XbaI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた Apoa5 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN281 と名前を付けた。

マウス肝臓 Poly(A)⁺RNA を用いて、配列表中の配列番号 7 6、7 7 に記載のプライマーにて、RT-PCR (Larrick, Trends Biotechnol. 10 146-152 (1992)) による増幅を行った。RT-PCR には STRATAGENE 社製の ProSTAR Ultra HF RT-PCR System を用い、その使用説明書通りに行った (以下全ての RT-PCR は同キットを用いて行った)。その結果、マウス由来 Cathepsin D 遺伝子 (Grusby et al., Nucleic Acids Res. 18 4008 (1990)、Babe et al., Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 17 213-252 (2000) : GenBank 受入番号 X52886) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NcoI と XbaI で二重消化し、pTip-LCH1 の NcoI、XbaI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた Cathepsin D 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN270 と名前を付けた。また、pHN270 を NcoI と SalI で二重消化して得られた 1.2kb の DNA 断片を pBAD/HisA の NcoI、XbaI 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pHN273 と名前をつけた。

マウス肝臓 Poly(A)⁺RNA を用いて、配列表中の配列番号 7 8、7 9 に記載のプ

ライマーにて、RT-PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Prothrombin 遺伝子 (Degen et al., DNA Cell Biol. 9 487-498 (1990) : GenBank 受入番号 X52308) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NcoI と XhoI で二重消化し、pTip-LCH1 の NcoI、XhoI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた Prothrombin 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN271 と名前を付けた。

マウス肝臓 Poly (A)⁺RNA を用いて、配列表中の配列番号 8 0、8 1 に記載のプライマーにて、RT-PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 Kallikrein 6 遺伝子 (Evans et al., J. Biol. Chem. 262 8027-8034 (1987)、Babe et al., Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 17 213-252 (2000) : GenBank 受入番号 NM#010639) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NcoI と XhoI で二重消化し、pTip-LCH1 の NcoI、XhoI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた Kallikrein 6 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN272 と名前を付けた。また、pHN272 を NcoI と SalI で二重消化して得られた 0.7kb の DNA 断片を pBAD/HisA の NcoI、XhoI 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pHN275 と名前をつけた。

マウス肝臓 Poly (A)⁺RNA を用いて、配列表中の配列番号 8 2、8 3 に記載のプライマーにて、RT-PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 LSDNAse 遺伝子 (Baron et al., Gene 215 291-301 (1998) : GenBank 受入番号 AF047355) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NdeI と XhoI で二重消化し、pTip-LNH1 の NdeI、XhoI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた LSDNAse 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN299 と名前を付けた。

マウス肝臓 Poly (A)⁺RNA を用いて、配列表中の配列番号 8 4、8 5 に記載のプライマーにて、RT-PCR による増幅を行った。その結果、マウス由来 DLAD 遺伝子 (Shiokawa and Tanuma, Nucleic Acids Res. 27 4083-4089 (1999) : GenBank 受入番号 AF128888) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NcoI と EcoRI で二重消化し、pTip-LNH2 の NcoI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた DLAD 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN284 と名前を付けた。

マウス肝臓 Poly(A)⁺RNA を用いて、配列表中の配列番号 8 6、8 7 に記載のプライマーにて、RT-PCR による增幅を行った。その結果、マウス由来 HMG-1 遺伝子 (Pauken et al., Mamm. Genome 5 91-99 (1994)、Lee et al., Gene 225 97-105 (1998) : GenBank 受入番号 U00431) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NcoI と EcoRI で二重消化し、pTip-LNH2 の NcoI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた HMG-1 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN285 と名前を付けた。また、プラスミド pHN285 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 8 8、8 7 に記載のプライマーを用いて、PCR による增幅を行った。その結果、マウス由来 HMG-1 遺伝子を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 XhoI と EcoRI で二重消化し、pBAD/HisA の XhoI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた HMG-1 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN305 と名前を付けた。

マウス肝臓 Poly(A)⁺RNA を用いて、配列表中の配列番号 8 9、9 0 に記載のプライマーにて、RT-PCR による增幅を行った。その結果、マウス由来 Kid1 遺伝子 (Tekki-Kessaris et al., Gene 240 13-22 (1999)、Suter-Crazzolara and Unsicker Bio/Technology 19 202-204 (1995) : GenBank 受入番号 AF184111) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NcoI と HindIII で二重消化し、pTip-LNH2 の NcoI、HindIII 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた Kid1 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN286 と名前を付けた。

マウス肝臓 Poly(A)⁺RNA を用いて、配列表中の配列番号 9 1、9 2 に記載のプライマーにて、RT-PCR による增幅を行った。その結果、マウス由来 Bax alpha 遺伝子 (Oltvai et al., Cell 74 609-619 (1993)、Donnelly et al., Protein Expr. Purif. 22 422-429 (2001) : GenBank 受入番号 L22472) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NdeI と EcoRI で二重消化し、pTip-LNH1 の NdeI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた Bax alpha 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN217 と名前を付けた。また、プラスミド pHN217 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 9 3、9 2 に記載のプライマーを用いて、PCR による增幅を行った。その結果、マウス由来 Bax alpha 遺伝子を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 XhoI と EcoRI で二重消化し、pBAD/HisA

の XhoI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた Bax alpha 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN212 と名前を付けた。

マウス肝臓 Poly (A) ⁺RNA を用いて、配列表中の配列番号 9 4、9 5 に記載のプライマーにて、RT-PCR による增幅を行った。その結果、マウス由来 Glucokinase 遺伝子 (Lin et al., Protein Expr. Purif. 1 169-176 (1990) : GenBank 受入番号 BC011139) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NdeI と XhoI で二重消化し、pTip-LNH1 の NdeI、XhoI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた Glucokinase 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN298 と名前を付けた。また、pHN298 を NcoI と XhoI で二重消化して得られた 1.4kb の DNA 断片を pBAD/HisA の NcoI、XhoI 部位にサブクローンした。その結果できたプラスミドに pHN306 と名前をつけた。

pET22b-Dmp37A を用いて、配列表中の配列番号 1 0 5、9 6 に記載のプライマーにて、PCR による增幅を行った。その結果、Drosophila melanogaster 由来 p37A をコードする遺伝子 (Holzl et al., J. Cell Biol. 150 119-129 (2000) : GenBank 受入番号 AF145312) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 NdeI と XhoI で二重消化し、pTip-LCH2 の NdeI、XhoI 部位にサブクローンした結果、TipA-LG10 プロモーターの制御下に置かれた p37A 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN291 と名前を付けた。また、プラスミド pHN291 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 9 7、2 5 に記載のプライマーを用いて、PCR による增幅を行った。その結果、Drosophila melanogaster 由来 p37A 遺伝子を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 SalI で消化後、NcoI で部分消化し (p37A 内部の NcoI で切断しないように)、pBAD/HisA の NcoI、XhoI 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた p37A 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN308 と名前を付けた。

プラスミド LE59 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 9 8、9 9 に記載のプライマーを用いて、PCR による增幅を行った。その結果、マウス由来 Pantothenate kinase 1 beta タンパク質をコードする遺伝子 (Rock et al., J. Biol. Chem. 275 1377-1383 (2000) : GenBank 受入番号 AF200357 : 以下 PanK と略記) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 XhoI と EcoRI で二重消化し、pBAD/HisA

の XhoI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた PanK 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN279 と名前を付けた。

マウス肝臓 Poly(A)⁺RNA を用いて、配列表 100、101 に記載のプライマーにて、RT-PCR による增幅を行った。その結果、マウス由来 Peroxiredoxin 4 をコードする遺伝子 (GenBank 受入番号 BC019578) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 XhoI と KpnI で二重消化し、pBAD/HisA の XhoI、KpnI 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた Peroxiredoxin 4 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN278 と名前を付けた。

プラスミド LE156 をテンプレートとして、配列表中の配列番号 102、103 に記載のプライマーを用いて、PCR による增幅を行った。その結果、マウス由来 Transferrin 様タンパク質をコードする遺伝子 (GenBank 受入番号 AK005035：以下 TFL と略記) を含む DNA を得た。この DNA 断片を制限酵素 XhoI と EcoRI で二重消化し、pBAD/HisA の XhoI、EcoRI 部位にサブクローンした結果、アラビノース誘導性プロモーターの制御下に置かれた TFL 遺伝子を含むプラスミドが作成され、pHN280 と名前を付けた。

また、上述したタンパク質のうち、シグナルペプチドを持つものは全てシグナルペプチドをコードする DNA 配列を除いてサブクローンされている。また、Prothrombin は成熟 Thrombin になる直前の「Prethrombin-2」をコードする DNA 配列 (Soejima et al., J. Biochem. 130 269-277 (2001)) がサブクローンされている。

pHN171 (実施例 7 に記載)、pHN205、pHN206、pHN208、pHN287、pHN289、pHN288、pHN270、pHN271、pHN272、pHN299、pHN284、pHN285、pHN286、pHN217、pHN298、pHN291 を用いて、実施例 12 と同様に Rhodococcus erythropolis JCM3201 株を形質転換し、実施例 13 に準じて各タンパク質を 30°C、4°C でそれぞれ発現させた。

これらのタンパク質には全て 6×His タグが末端についており、実施例 16 と同様に精製を行った。またこれに加え、今回は細胞破壊後に 20,000×g にて遠心してできた沈殿 (実施例 16 に記載) からも精製を行った。具体的に以下に沈殿物からの精製法を示すが、その作業は室温で行った。1ml の DN-Buffer (50mM

Tris-HCl (pH8.0)、8M 尿素) に沈殿物を懸濁し、20,000×g にて遠心し、その上清 700 μl に、予め DN-Buffer で平衡化された Ni-NTA Superflow をベッド体積 40 μl になるように加えた。これを 1 時間回転攪拌しながら Ni-NTA Superflow ビーズと 6×His タグのついたタンパク質とを結合させた。このビーズを DN-Buffer で 4 回洗浄した後、120 μl の DNE-Buffer (50mM Tris-HCl (pH7.0)、8M 尿素、400mM イミダゾール) に 3 回懸濁することで、ビーズから 6×His タグのついたタンパク質を溶出させた。

pBAD/His/lacZ (Invitrogen 社)、pHN193、pHN195、pHN199、pHN276、pHN277、pHN281、pHN273、pHN275、pHN305、pHN212、pHN306、pHN308、pHN279、pHN278、pHN280 を用い、Invitrogen 社の pBAD/His キットの使用説明書の通りに、大腸菌にてタンパク質の発現を行った。

以下に具体的な精製法を示す。タンパク質を発現させた菌体を回収し、1ml の NT-Buffer に懸濁した。これを超音波発生器 UD-20 (TOMY 社製) を用いて細胞を破壊した。20,000×g にて遠心し、その上清 900 μl に、予め、NT-Buffer で平衡化された Ni-NTA Superflow をベッド体積 40 μl になるように加えた。これを 1 時間回転攪拌しながら Ni-NTA Superflow ビーズと 6×His タグのついたタンパク質とを結合させた。このビーズを NT-Buffer で 4 回洗浄した後、120 μl の NTE-Buffer に 3 回懸濁することで、ビーズから 6×His タグのついたタンパク質を溶出させた。上記の作業はすべて 4°C で行った。

また、細胞破壊後、20,000×g にて遠心してできた沈殿からも精製を行ったが、その作業工程は上述した方法と同様である。

上記サンプルのうち 10 μl を常法に従い 12% SDS ポリアクリルアミド電気泳動に供し、デンシトメーターにてバンドの密度を測定し、定量した結果を図 21 に示す。該図において、左から 2 番目のカラムは発現させたタンパク質の名前を示す。左から 3 番目のカラムは発現させたタンパク質の N 末端、C 末端どちらに 6×His タグを付けたかを示す。左から 4 番目のカラムは、シグナル配列等を含めた完全長のタンパク質の推定分子量 (kDa) を示すが、括弧内の数字は実際に発現させたタンパク質部分の推定分子量を示す。左から 5、9 番目のカラムはタンパク質を発現させた時に用いたプラスミドの名前を示す。左から 6、8、10 番目のカラムは 1 リットルの培養液あたり、得られた組み換えタンパク質の質量を示すが(単

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

位はミリグラム)、20,000×g での上清画分 (Sup) から精製したときと、沈殿画分 (Ppt) から精製したときとに分けて示してある。左から 7、11 番目のカラム中の+、-はそれぞれの形質転換体を発現誘導剤 (Rhodococcus erythropolis の場合は 1 μ g/ml のチオストレプトン、大腸菌の場合は 0.2% L-アラビノース) を含んだ寒天培地上に塗布した時の、増殖の速度を表している。最も早く増殖した形質転換体が+++で、全く増殖しなかった形質転換体が-である。また、用いた宿主、発現誘導時の温度が最上部に示されている。N. D. (Not Detected) は検出限界以下だったことを示す。

表 1 に実施例で用いた各プラスミドのリストを、表 2 に実施例で用いた菌株のリストを示す。

表 1

カテゴリー	プラスミド名	備考	ソース
市販のクローニングベクター	pBluescript II SK (+)	Conventional vector for general cloning	Stratagene
	pGEM 3Z (+)	Conventional vector for general cloning	Promega
発現ベクターのソース	pRE2895	Source of RepA & B Cryptic plasmid isolated from <i>R. erythropolis</i> JCM 2895)	This study
	pHN136	Backbone of the expression vector	This study
	pHN143	Source of Thb ^r	This study
	pHN62	Source of ALDhp-TpA (inducer cassette)	This study
	pHN153	Source of TpAp-P P O R F-ALDht Expression cassette)	This study
コントロールプラスミド	pHN169	Source of Tuflp-Tet ^r	This study
	pHN172	Neither Expression cassette nor Inducer cassette	This study
	pHN173	Expression cassette, but no Inducer cassette	This study
<i>R. erythropolis</i> 中の発現プラスミド (標的遺伝子含まず)	pTp-NH1	TpAp, 6xH is at N-term inus, MCS type1	This study
	pTp-CH1	TpAp, 6xH is at C-term inus, MCS type1	This study
	pTp-NH2	TpAp, 6xH is at N-term inus, MCS type2	This study
	pTp-CH2	TpAp, 6xH is at C-term inus, MCS type2	This study
	pTp-LNH1	TpA-LG10p, 6xH is at N-term inus, MCS type1	This study
	pTp-LCH1	TpA-LG10p, 6xH is at C-term inus, MCS type1	This study
	pTp-LNH2	TpA-LG10p, 6xH is at N-term inus, MCS type2	This study
	pTp-LCH2	TpA-LG10p, 6xH is at C-term inus, MCS type2	This study
	pTp-CH1.1	TpAp, 6xH is at N-term inus, MCS type3	This study
	pTp-CH2.1	TpAp, 6xH is at C-term inus, MCS type3	This study
	pTp-LCH1.1	TpA-LG10p, 6xH is at N-term inus, MCS type3	This study
	pTp-LCH2.1	TpA-LG10p, 6xH is at C-term inus, MCS type3	This study
<i>R. erythropolis</i> 中の発現プラスミド (標的遺伝子含む)	pHN170	Target=PIP in pTp-CH1	This study
	pHN171	Target=PIP in pTp-LCH1	This study
	pHN176	Target=ATPIP in pTp-CH1	This study
	pHN177	Target=ATPIP in pTp-LCH1	This study
	pHN187	Target=GFP in pTp-NH1	This study
	pHN186	Target=GFP in pTp-LNH1	This study
	pHN282	Target=GST in pTp-NH2	This study
	pHN283	Target=GST in pTp-LNH2	This study
	pHN205	Target=Saa1 in pTp-LNH1	This study
	pHN206	Target=NADH4 in pTp-LNH1	This study
	pHN208	Target=Cytochrome b5 in pTp-LNH1	This study
	pHN287	Target=LE123 in pTp-LNH1	This study
	pHN289	Target=Transferrin in pTp-LNH1	This study
	pHN288	Target=Apoa5 in pTp-LNH2	This study
	pHN270	Target=Cathepsin D in pTp-LCH1	This study
	pHN271	Target=Prothrombin in pTp-LCH1	This study
	pHN272	Target=Kallikrein6 in pTp-LCH1	This study
	pHN299	Target=LSDNase in pTp-LNH1	This study
	pHN284	Target=DLAD in pTp-LNH2	This study
	pHN285	Target=HMG-1 in pTp-LNH2	This study
	pHN286	Target=Kid1 in pTp-LNH2	This study
	pHN217	Target=Bax abha in pTp-LNH1	This study
	pHN298	Target=G lucokinase in pTp-LNH1	This study
	pHN291	Target=p37A in pTp-LCH2	This study

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

カテゴリー	プラスミド名	備考	ソース
<i>E. coli</i> 中の発現プラスミド 標的遺伝子含まず)	pBAD/H isA	BAD promoter, 6xH is at N-terminal, Xpress Epitope, MCS	Invitrogen
	pBAD-Linker	BAD promoter, for library construction	This study
<i>E. coli</i> 中の発現プラスミド 標的遺伝子含む)	pHN193	Target: <i>Saa1</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN195	Target: <i>NADH4</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN199	Target: <i>Cytochrome b51</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN276	Target: <i>LE123</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN277	Target: <i>Transferrin</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN281	Target: <i>Apoa5</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN273	Target: <i>Cathepsin D</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN275	Target: <i>Kallikrein6</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN305	Target: <i>HMG-1</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN212	Target: <i>Bax abha</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN306	Target: <i>G lucokinase</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN308	Target: <i>p37A</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN279	Target: <i>PanK</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN278	Target: <i>Peroxiredoxin4</i> in pBAD/H isA	This study
	pHN280	Target: <i>TFL</i> in pBAD/H isA	This study
	pBAD/H is/lacZ	Target: <i>lacZ</i>	Invitrogen

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

表 2

種	株名	別名	ソース	使用
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	JCM 2895	ATCC 15962	Japan Collection of Microorganism S	Source of pRE2895 (Source of RepA&B)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	JCM 3201	ATCC 4277	Japan Collection of Microorganism S	Host strain to express recombinant proteins Source of ALDHP Source of ALDHT
<i>Rhodococcus fascians</i>	JCM 10002	ATCC 12974	Japan Collection of Microorganism S	Host strain to express recombinant proteins
<i>Rhodococcus opacus</i>	DSM 44193	PD 630	German Collection of Microorganism S and Cell Cultures	Host strain to express recombinant proteins
<i>Streptomyces coelicolor</i>	JCM 4979	A3(2)	Japan Collection of Microorganism S	Source of <i>TpaA</i>
<i>Streptomyces azureus</i>	JCM 4217	ATCC 14921	Japan Collection of Microorganism S	Source of TufP
<i>Escherichia coli</i>	TOP10		Invitrogen	Source of Thio ^r
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α			Host strain to express recombinant proteins General cloning

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

実施例13から18並びに実施例20に示されるように、本発明の発現ベクターを用いることにより、4°Cという低温条件下で外来遺伝子のコードするタンパク質を発現產生させることが可能である。

配列表フリーワード

配列1～105：プライマー

配列106～113：ベクター

請求の範囲

1. 宿主細胞中で外来遺伝子を誘導物質により誘導発現し得る発現ベクターであって、該宿主以外の宿主の好適生育温度範囲以下の温度で発現し得る発現ベクター。
2. 宿主細胞中で外来遺伝子を誘導物質により誘導発現し得る発現ベクターであって、15°C以下の温度で発現し得る発現ベクター。
3. 4°Cで発現し得る請求項1または2記載の発現ベクター。
4. 宿主細胞が Rhodococcus 属細菌である、請求項1から3のいずれか1項に記載の発現ベクター。
5. Rhodococcus 属細菌が R. erythropolis、R. fascians および R. opacus からなる群から選択される、請求項4記載の発現ベクター。
6. 誘導物質がチオストレプトンである、請求項1から5のいずれか1項に記載の発現ベクター。
7. 外来遺伝子が、15°Cを超える中高温条件下で宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする、請求項1～6のいずれか1項に記載の発現ベクター。
8. 誘導物質により発現を調節し得るプロモーター配列、外来遺伝子を導入可能なマルチクローニング部位を含む請求項1から7のいずれか1項に記載の発現ベクター。
9. 請求項1から8のいずれか1項に記載の発現ベクターを含む形質転換体。
10. 請求項1から8のいずれか1項に記載の発現ベクターを用いてタンパク質を產生する方法。
 11. 宿主細胞の好適生育温度範囲内の温度で発現させた場合に該宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする遺伝子を、該宿主細胞の好適生育温度範囲より低い好適生育温度範囲を有する他の宿主細胞中で誘導物質により誘導発現し得る誘導型発現ベクター。
 12. 4°Cで発現し得る請求項11記載の発現ベクター。
 13. 宿主細胞が Rhodococcus 属細菌である、請求項11または12に記載の発現ベクター。
 14. Rhodococcus 属細菌が R. erythropolis、R. fascians および R. opacus

からなる群から選択される、請求項 1 3 記載の発現ベクター。

15. 誘導物質がチオストレプトンである、請求項 1 1 から 1 4 のいずれか 1 項に記載の発現ベクター。

16. 誘導物質により発現を調節し得るプロモーター配列、外来遺伝子を導入可能なマルチクローニング部位を含む請求項 1 1 から 1 5 のいずれか 1 項に記載の発現ベクター。

17. 請求項 1 1 から 1 6 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを含む形質転換体。

18. 請求項 1 1 から 1 6 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを用いてタンパク質を產生する方法。

19. Rhodococcus 属細菌中で外来遺伝子を誘導物質により誘導発現し得る発現ベクター。

20. Rhodococcus 属細菌が R. erythropolis、R. fascians および R. opacus からなる群から選択される、請求項 1 9 記載の発現ベクター。

21. 誘導物質がチオストレプトンである、請求項 1 9 または 2 0 記載の発現ベクター。

22. TipA 遺伝子プロモーター配列、外来遺伝子を導入可能な第 1 のマルチクローニング部位および転写終結配列を含む発現カセット、第 2 のプロモーター配列および TipA 遺伝子を含む誘導カセット、Rhodococcus 属細菌用プラスミドの自律複製に必須な DNA 領域ならびにチオストレプトン耐性遺伝子を含む、請求項 1 9 から 2 1 のいずれか 1 項に記載の発現ベクター。

23. 請求項 1 9 ～ 2 2 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを含む Rhodococcus 属細菌形質転換体。

24. 請求項 1 9 から 2 2 のいずれか 1 項に記載の発現ベクターを用いてタンパク質を產生する方法。

25. 15°C を超える中高温条件下では発現産物が宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質をコードする遺伝子を、低温条件下で増殖可能な Rhodococcus 属細菌で誘導発現し得る Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター。

26. TipA 遺伝子プロモーター配列、外来遺伝子を導入可能な第 1 のマルチクローニング部位および転写終結配列を含む発現カセット、第 2 のプロモーター

配列および TipA 遺伝子を含む誘導力セット、Rhodococcus 属細菌用プラスミドの自律複製に必須な DNA 領域ならびにチオストレプトン耐性遺伝子を含む、外来遺伝子を低温条件下で増殖可能な Rhodococcus 属細菌内で誘導発現し得る Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター。

27. さらに大腸菌用プラスミドの自律複製に必須な DNA 領域を含み、大腸菌中で複製可能な請求項 26 記載の Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター。

28. TipA 遺伝子プロモーターが TipA-LG10 プロモーターである請求項 26 または 27 に記載の Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター。

29. 配列番号 106 に表される塩基配列を有する pTip-NH1、配列番号 107 に表される塩基配列を有する pTip-NH2、配列番号 108 に表される塩基配列を有する pTip-CH1、配列番号 109 に表される塩基配列を有する pTip-CH2、配列番号 110 に表される塩基配列を有する pTip-LNH1、配列番号 111 に表される塩基配列を有する pTip-LNH2、配列番号 112 に表される塩基配列を有する pTip-LCH1、配列番号 113 に表される塩基配列を有する pTip-LCH2、pTip-CH1.1、pTip-CH2.1、pTip-LCH1.1 および pTip-LCH2.1 からなる群から選択される請求項 26 から 28 のいずれか 1 項に記載の Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター。

30. Rhodococcus 属細菌が R. erythropolis、R. fascians および R. opacus からなる群から選択される、請求項 25 から 29 のいずれか 1 項に記載の Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター。

31. 請求項 25 から 30 のいずれか 1 項に記載の Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクターを含む Rhodococcus 属細菌形質転換体。

32. 外来遺伝子として 15°C を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をコードする遺伝子を含む請求項 25 から 30 のいずれか 1 項に記載の Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能な Rhodococcus 属細菌に導入し、低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記 Rhodococcus 属細菌用誘導型発現ベクター導入細菌を培養することを含む、15°C を超える中高温条件下では発現産物が宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質を低温で產生させる方法。

33. 15°C を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、15°C を超える中高温条件下では宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質である、請求項 3

2記載のタンパク質を低温で產生させる方法。

34. 15°Cを超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、大腸菌で15°Cを超える中高温で発現させた場合に不活性な封入体を作るタンパク質である、請求項32記載のタンパク質を低温で產生させる方法。

35. 好冷菌または低温環境下に生存する動物もしくは植物由来のタンパク質をコードする遺伝子を含む請求項25から30のいずれか1項に記載のRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能なRhodococcus属細菌に導入し、低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記Rhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター導入細菌を培養することを含む、好冷菌または低温環境下に生存する動物もしくは植物由来のタンパク質を低温で產生させる方法。

36. 外来遺伝子を含む請求項25から30のいずれか1項に記載のRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能なRhodococcus属細菌に導入し、15°Cを超える中高温条件下および低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記Rhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター導入細菌を培養し、15°C以下の低温条件下でのみ発現される遺伝子を選択することを含む、15°Cを超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングする方法。

37. 15°Cを超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、15°Cを超える中高温条件下では宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質である、請求項36記載の15°Cを超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングする方法。

38. 大腸菌に導入し15°Cを超える中高温で発現させよとした場合に、発現しないかまたは大腸菌の増殖を阻害する遺伝子を選択し、次いで該遺伝子を外来遺伝子として含む請求項25から30のいずれか1項に記載のRhodococcus属細菌用誘導型発現ベクターを低温で増殖可能なRhodococcus属細菌に導入し、低温条件下でチオストレプトンを含む培地を用いて前記Rhodococcus属細菌用誘導型発現ベクター導入細菌を培養したときに発現しうる遺伝子を選択することを含む、15°Cを超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングする方法。

39. 15°Cを超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、大腸菌

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

の増殖を 30°C 以上で阻害するタンパク質である、請求項 3 8 記載のタンパク質をスクリーニングする方法。

4 0 . 15°C を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、大腸菌で 15°C を超える中高温で発現させた場合に封入体を作るタンパク質である、請求項 3 8 記載のタンパク質をスクリーニングする方法。

4 1 . 15°C を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質が、15°C を超える中高温条件下では宿主細胞の増殖を阻害するタンパク質である、請求項 3 8 記載の 15°C を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質をスクリーニングする方法。

4 2 . 請求項 3 6 から 4 1 のいずれか 1 項に記載のスクリーニングする方法により得られた 15°C を超える中高温で発現させることが困難なタンパク質。

図 1

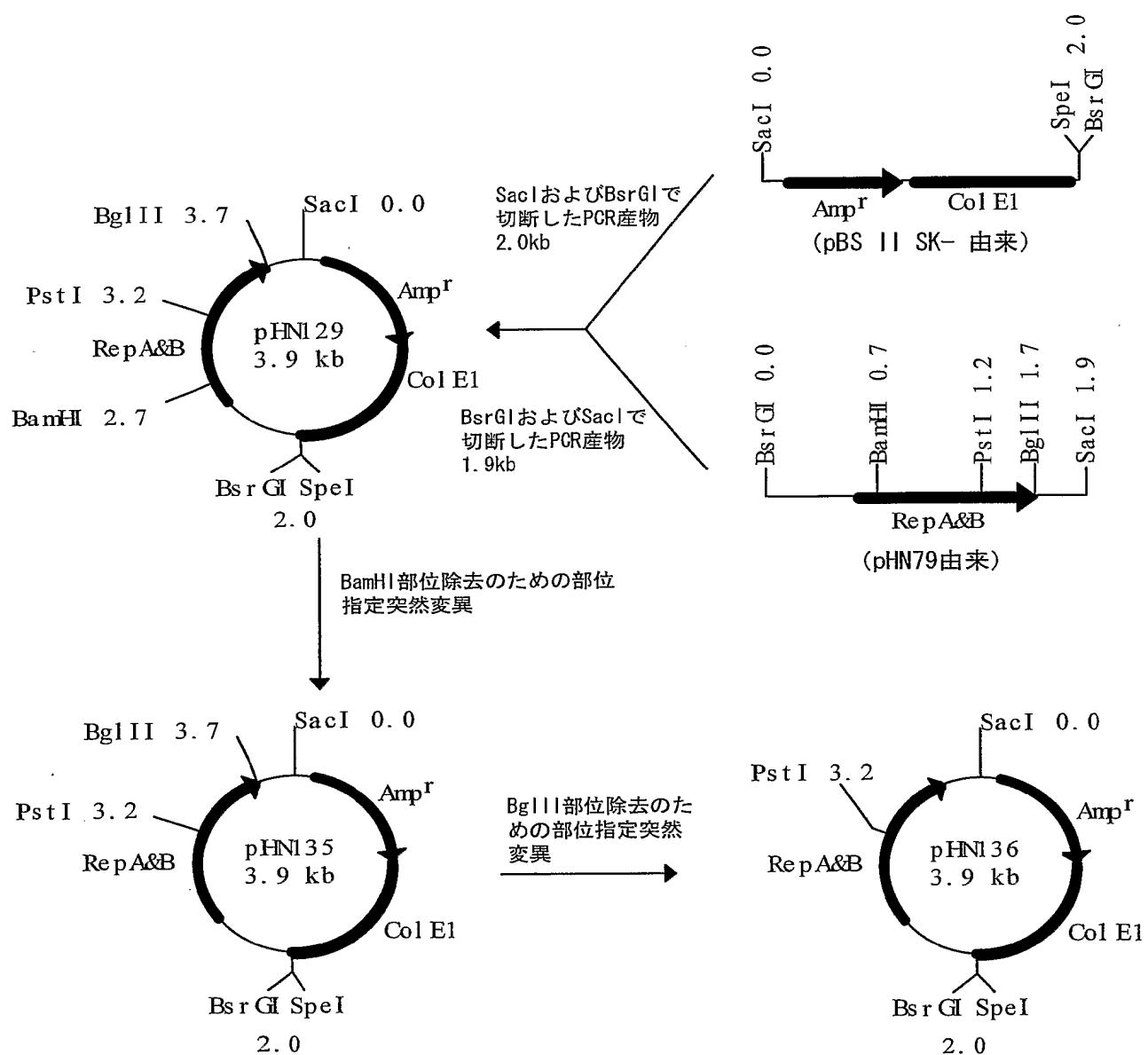


図 2

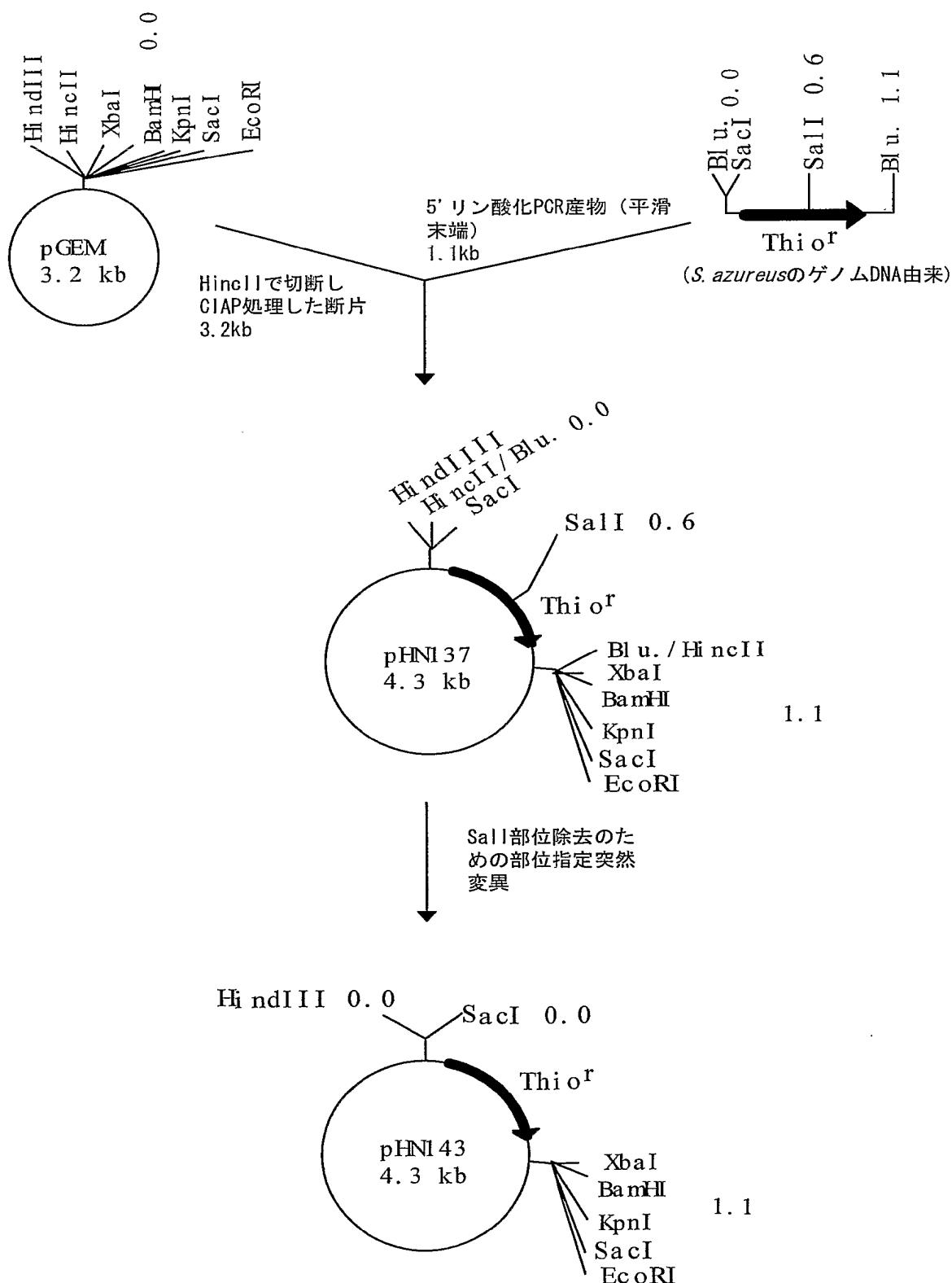


図 3

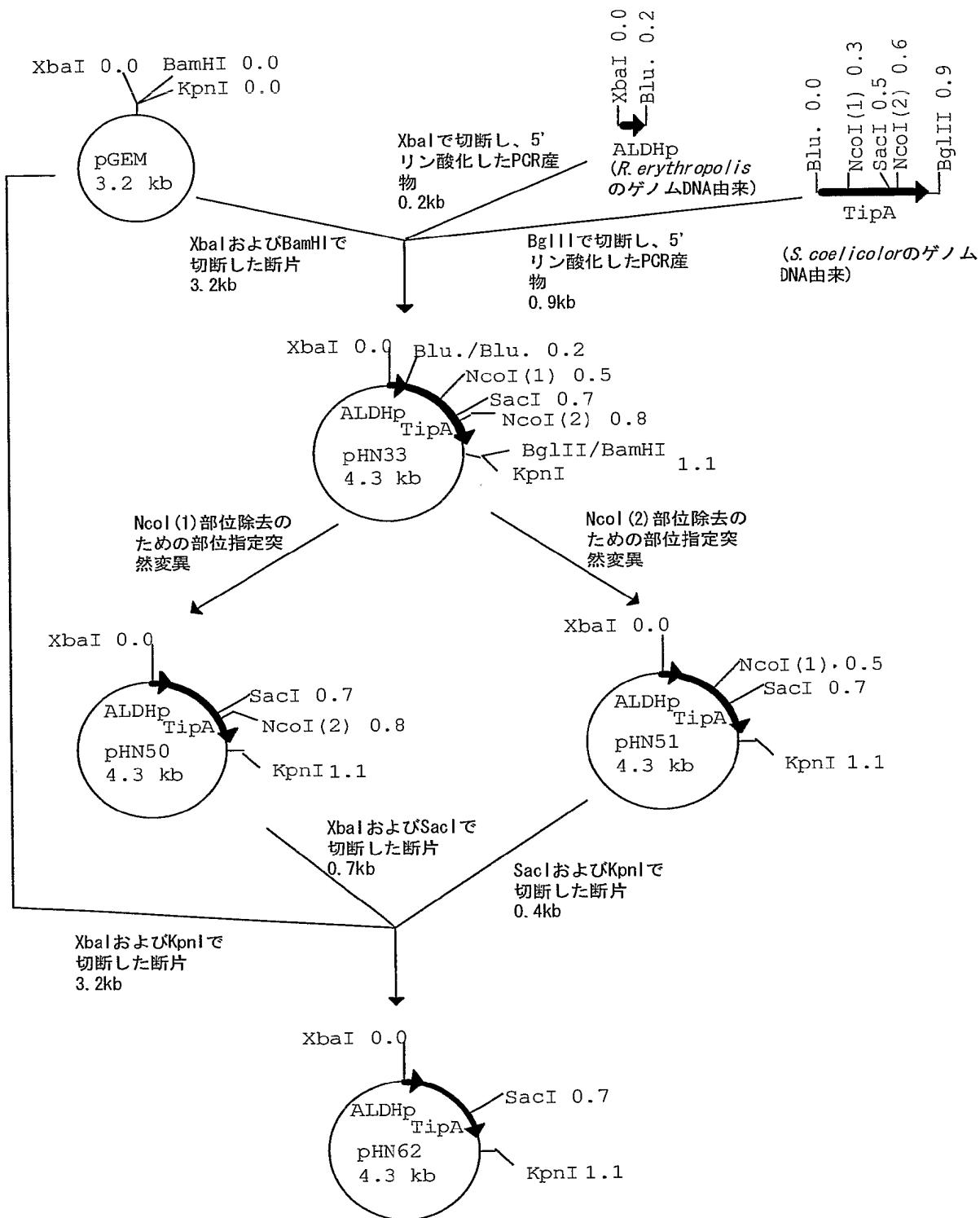


図 4

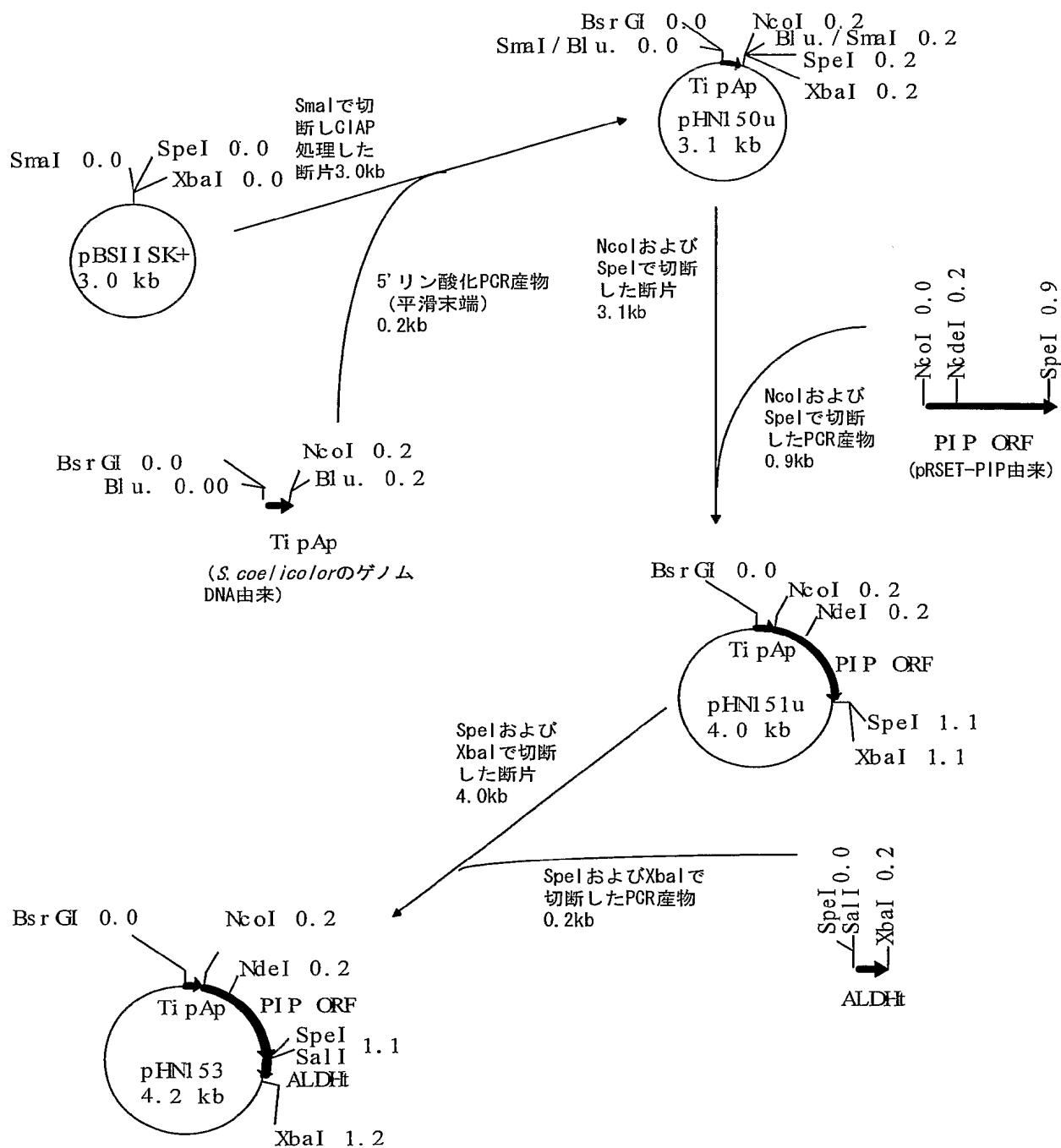


図 5

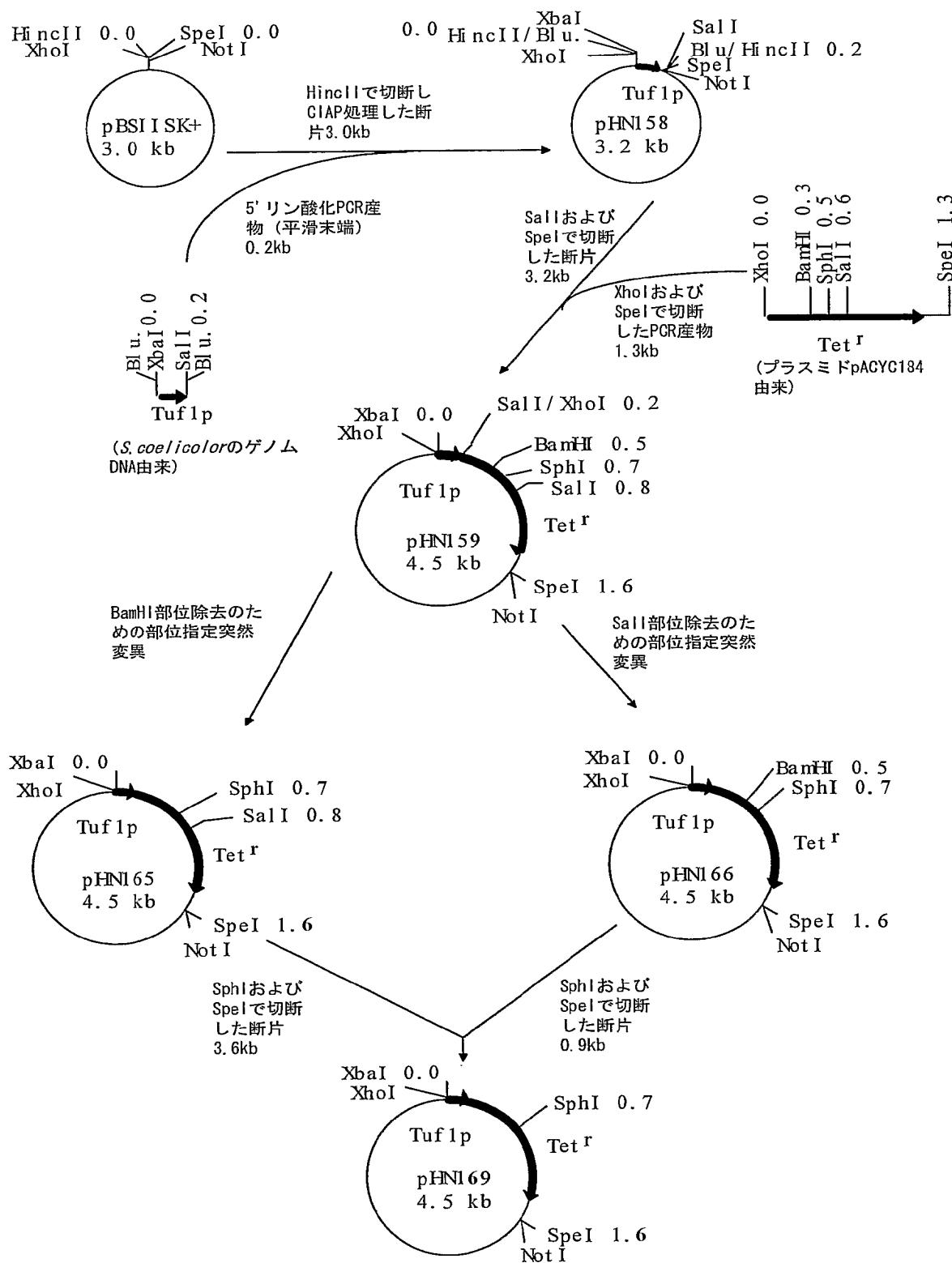


図 6

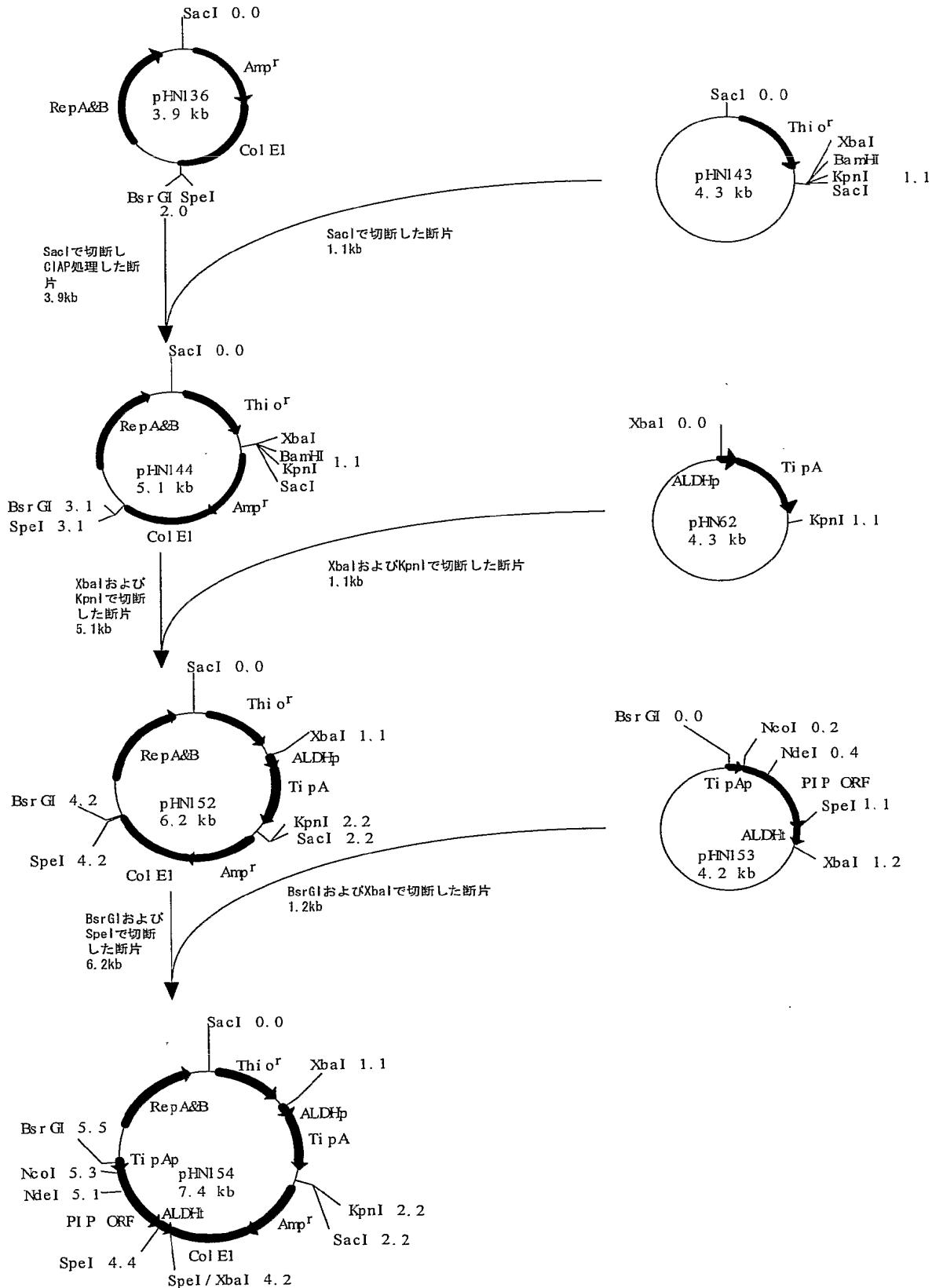
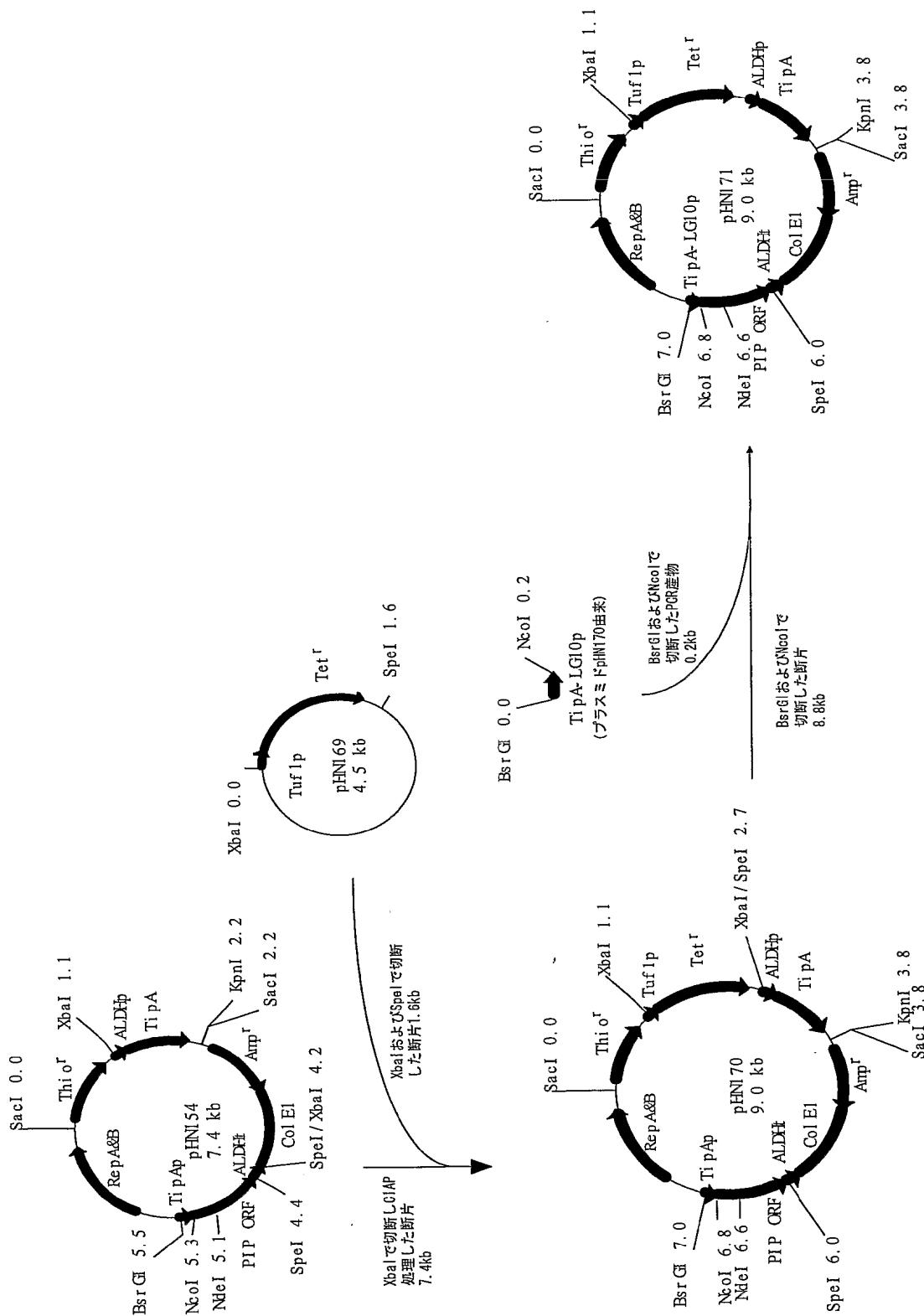


図 6



WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

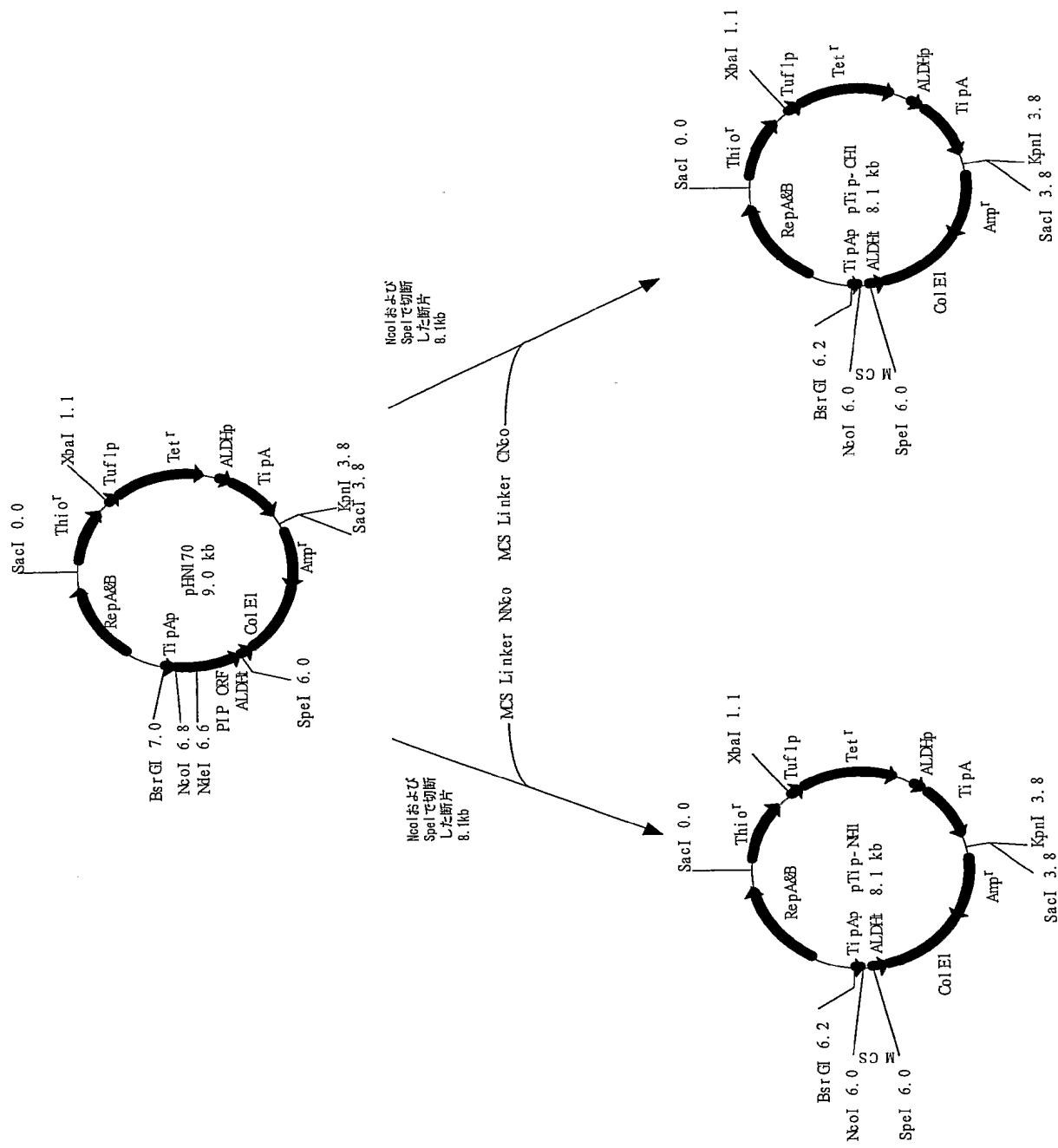


図 7

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

図 7

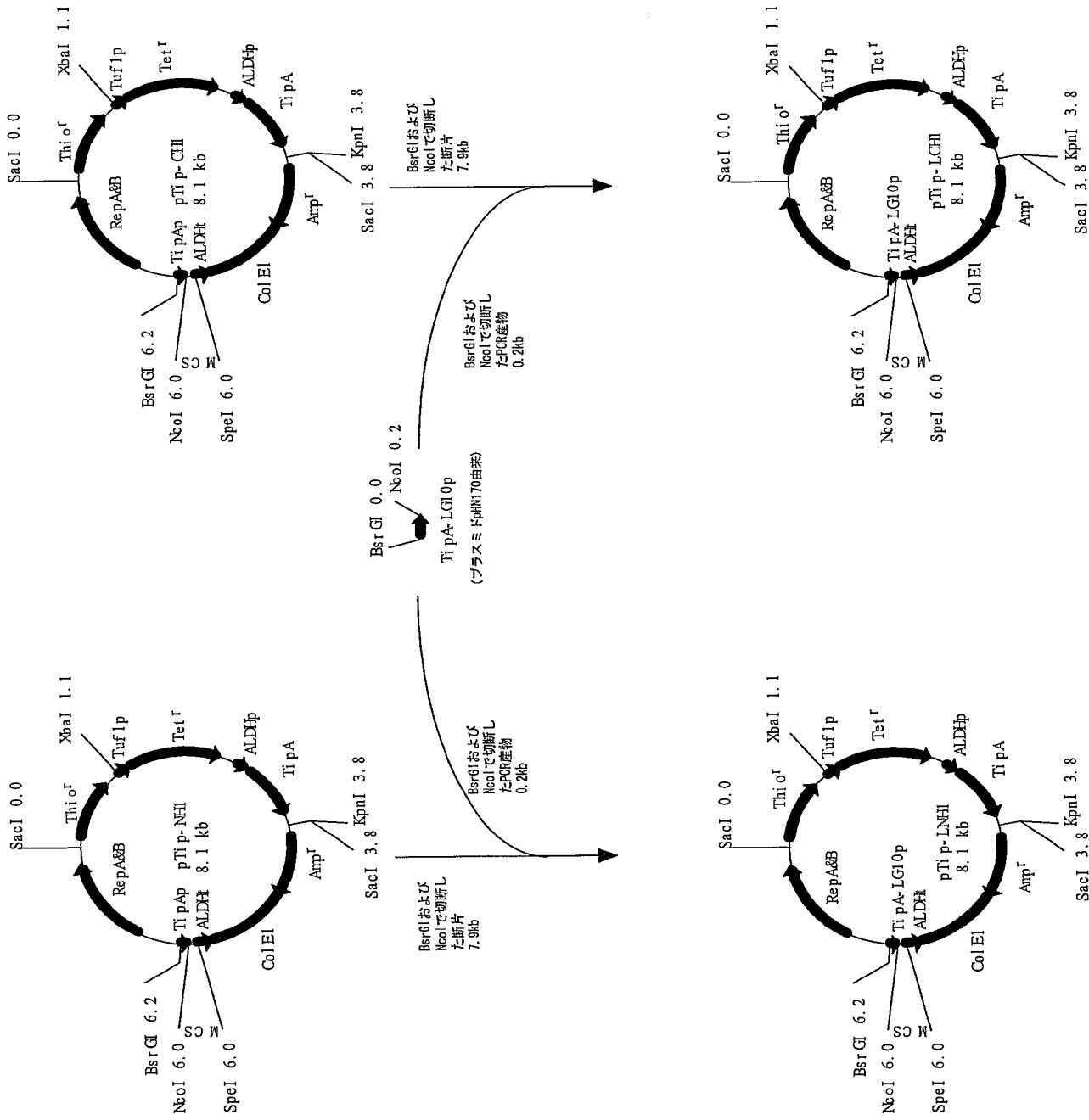
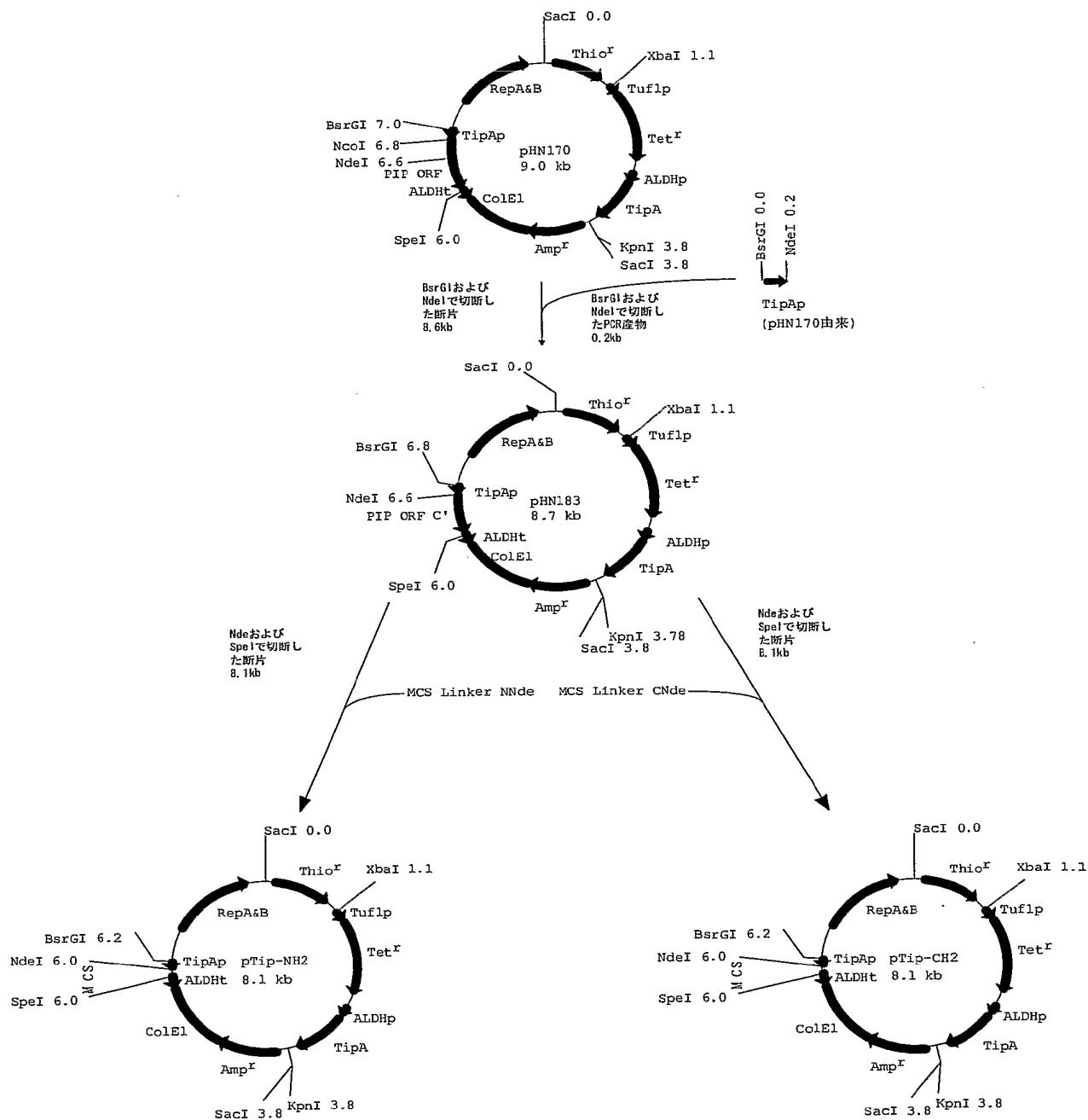


図 8



WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

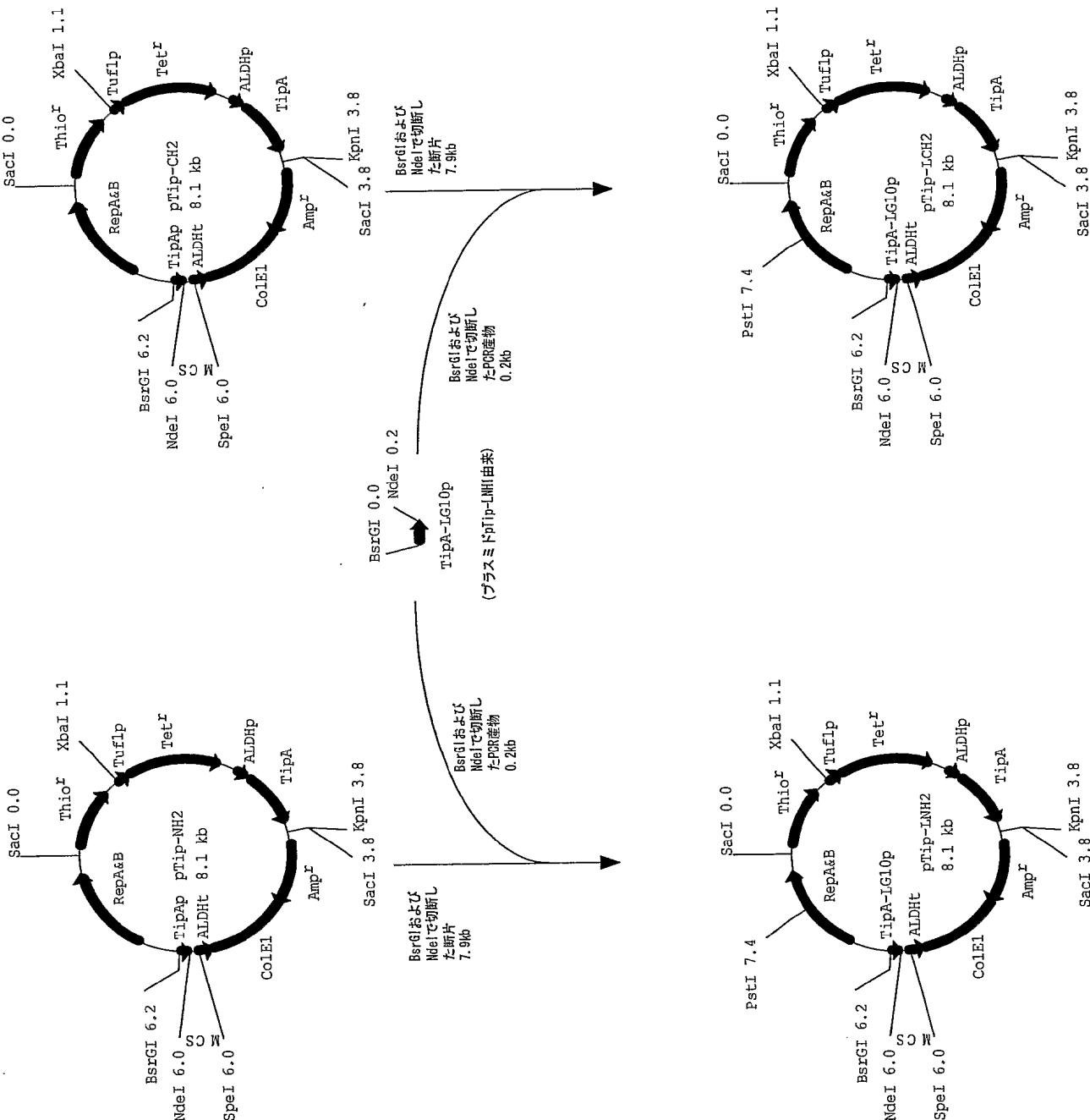
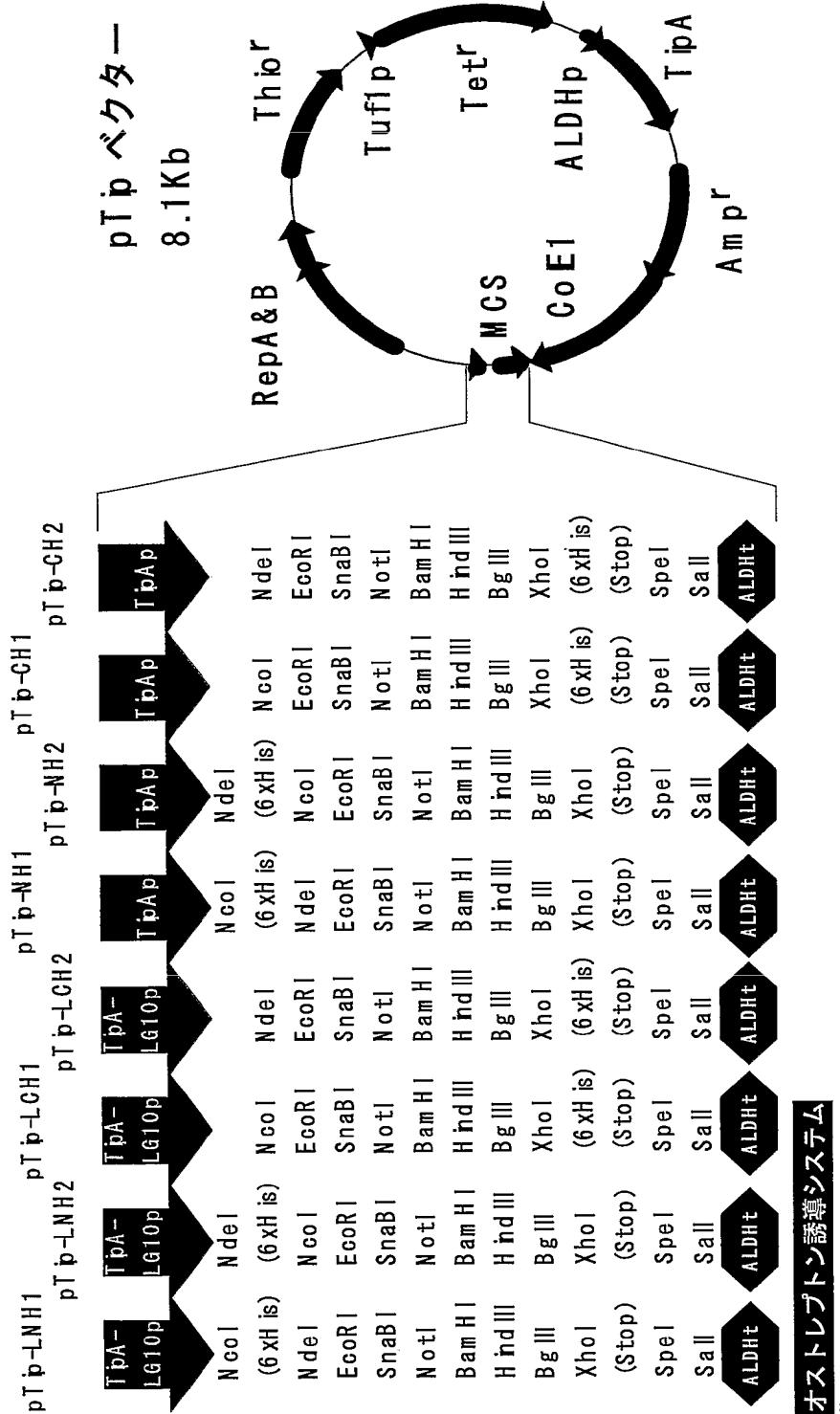


図 8

9 a



|| $h_{10} = R. erythropoisis$ || ヒト赤血球

LDH_p = TipAタンパク質を構成するプロモーター

「 $\text{TipA} = \text{TipA}$ タンパク質をコードする
 $\text{TipA} = \text{TipA}$ プロモーター
 $\text{TipA-LG10p} = \text{改良 TipA}$ プロモーター

Tufip-Tet^r = *R. erythropylos*用形質転換マーカー

アノ ρ^r = 太陽菌 (*E. coli*) 球形質転換マーカー

抗生物質耐性マーカー

プラスミドの自律複製に必須な領域

Co|E1 = 大腸菌 (*E. coli*) 用

RepA & B = *R. erythropoisis* 用

12/31

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

91

GTC TAG AAA TAA TTT TGT TTA ACT TTA AGA AGG AGA TAT ACC
 ↓
 BstXI NcoI
 10 35 100
 ACG TCA CGT GAG GCA GCG TGG ACG GCG TCA GAG AAG GGA GCG GCG ATG
 RBS

Diagram of the pET28b(+) vector showing restriction enzyme cleavage sites and restriction maps. The vector is a circular plasmid with various restriction sites marked: NdeI, EcoRI, SmaI, NotI, BamHI, KpnI, BglII, XbaI, SphI, SpeI, SalI, and Khol. The map shows the positions of these sites relative to the vector's ends and internal features. The vector ends are indicated by arrows pointing outwards. The sequence of the vector is shown as a series of letters representing the nucleotide sequence.

CTC GCT GCG GGT GCC GGT GCG AGG GAC TGC AAC ACG CGA AAC CTG CAC AAA

CAC ACG GAG GTT GGA ATG AGC GCC ACG GAC ACA CCC GAT ACC GGC GCC GTT

CCA CCC CGG TTG GTG ACC ACC GCT GGG GCG GCT GAC CTG CTA CGC CGC CTC

AGC GGG ACT CTA GT

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

90

BsrGI GTG TAC ATA TCG AGG CGG GCT CCC ACG GCC CGG GCT GAG GGA GCC GAC GGC ACG CGG CGG CTC ACG GCG TGG CAC GCG GAA CGT CGG GGC TTG CAC
CTC

The diagram illustrates the pET28b(+) vector structure. It features a multiple cloning site (MCS) with restriction sites *Eco*I, *Sma*I, *Not*I, *Bam*HI, *Hind*III, *Bgl*II, and *Xba*I. Below the MCS is a polyA signal sequence (AATAAA).

CAT CAC CAT CAC TGA ACT AGT CGA CCC ACC GGC ACC CGT GAG CCC CTC GCT
 His His His His *

GGG GGT GCC GGT GCG AGG GAC TGC AAC ACG CGA AAC CTG CAC AAA CAC ACG

GAG GTT GGA ATG AGC GCC ACG GAC ACA CCC GAT ACC GGC GCC GTT CCA CCC

CGG TTG GTG ACC ACC GCT GGG GCG GCT GAC CTG CTA CGC CGC CTC AGC GGG

ACT GTA GT

☒ 9 d

Bsr GI
GTG TAC ATA TCG AGG CGG CCC ACG GCC GCG TGG CAC GCG GAA CGT CGG CCC TGG AAC CTC

GGC ACG CGG CGG CTC ACG GCG TGG CAC GCG GAA CGT CGG CCC TGG AAC CTC
-35

ACG TCA CGT GAG GAG GCA GCG TGG ACG GCT TCA GAG AAG GGA GCG GAT ATG
-10 RBS
G TCT AGA AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT

Nde I
GGC CAT CAC CAT CAC CAT CAC GGC ATG GGA ATT CTA CGT AGC GGC CGC GGA
Gly His His His His Ala Met Gly Ile Leu Arg Ser Gly Arg Gly
Nco I *Eco* RI *Sma* II *Not* I
GGC AAG CTT AGA TCT GGA ACT AGT CGA CGC ACC GGC ACC CGT GAG
Ser Lys Leu Arg Ser Arg Gly *

Bam HI *Hind* III *Bgl* II *Xba* I
TCC AAG CTT AGA TCT GGA GGA TGA ACT AGT CGA CGC ACC GGC ACC CGT GAG
Ser Lys Leu Arg Ser Arg Gly *

Sph I
CCC CTC GCT GCG GGT GCG AGG GAC TGC AAC ACG CGA AAC CTG CAC

AAA CAC ACG GAG GTT GGA ATG AGC GCC AGG GAC ACA CCC GAT ACC GGC GGC

GTT CCA CGG CGG TTG GTG ACC ACC GCT GGG GCG GCT GAC CTG CTA CGG CGC

CTG AGC GGG ACT CTA GT

☒ 9 e

Bsr GI
 GTG TAC ATA TCG AGG CGG GCT CCC ACG GCC GCG CGG GCT GAG GGA GCC GAC

GGG ACG CGG CGG CTC ACG GCG TGG CAC GCG GAA CGT CGG GGC GGG TGG CAC CTC
 -35

Nde I
 ACG TCA CGT GAG GAG GCA GCG TGG ACG GCG TCA GAG AAG GGA GCG GAT ATG
 -10 RBS Met
 G TCT AGA AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT

Eco RI *Sma* I *Not* I *Bam* H I *Hind* III *Bg* I *I* *Xba* I
 GGA ATT CTA CGT AGC GAC CGC GCA TCC AAG CTT AGA TCT CGA GGA CAT CAC
 Gly Ile Leu Arg Ser Gly Arg Gly Ser Lys Leu Arg Ser Arg Gly His His

Sac I
 CAT GAC CAT GAC TGA ACT AGT CGA CCC ACC GGC ACC CGT GAG CCC CTC GCT
 His His His His *
 GCG GGT GCC GGT GCG AGG GAC TGG AAC ACG CGA AAC CTG CAC AAA GAC ACG

GAG GTT GGA ATG AGC GCC ACG GAC ACA CCC GAT ACC GGC GCT GTT CCA CCC

CGG TTG GTG ACC ACC GCT GGG GCG GCT GAC CTG CTA CGC CGC CTC AGC GGG

ACT CTA GT

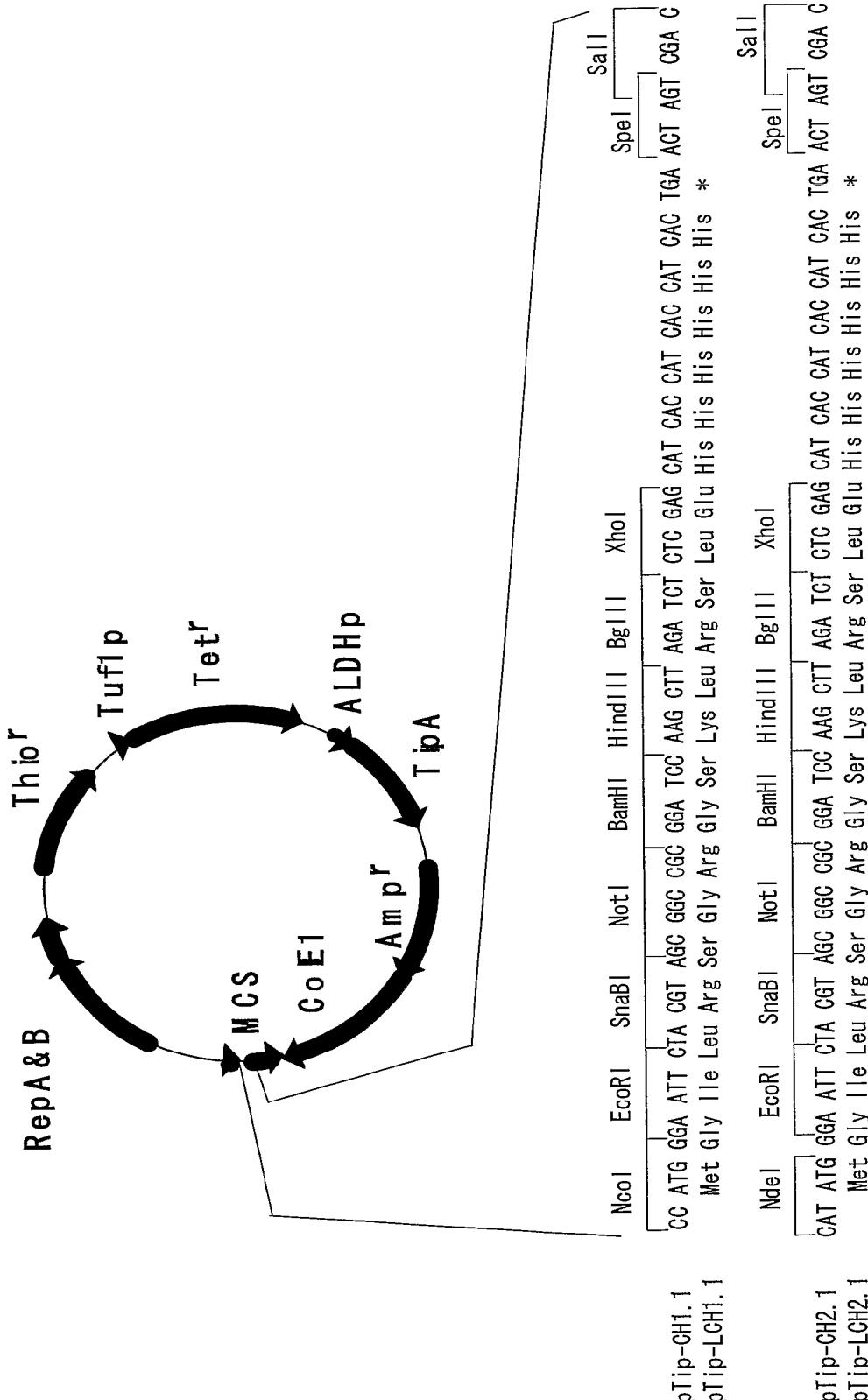
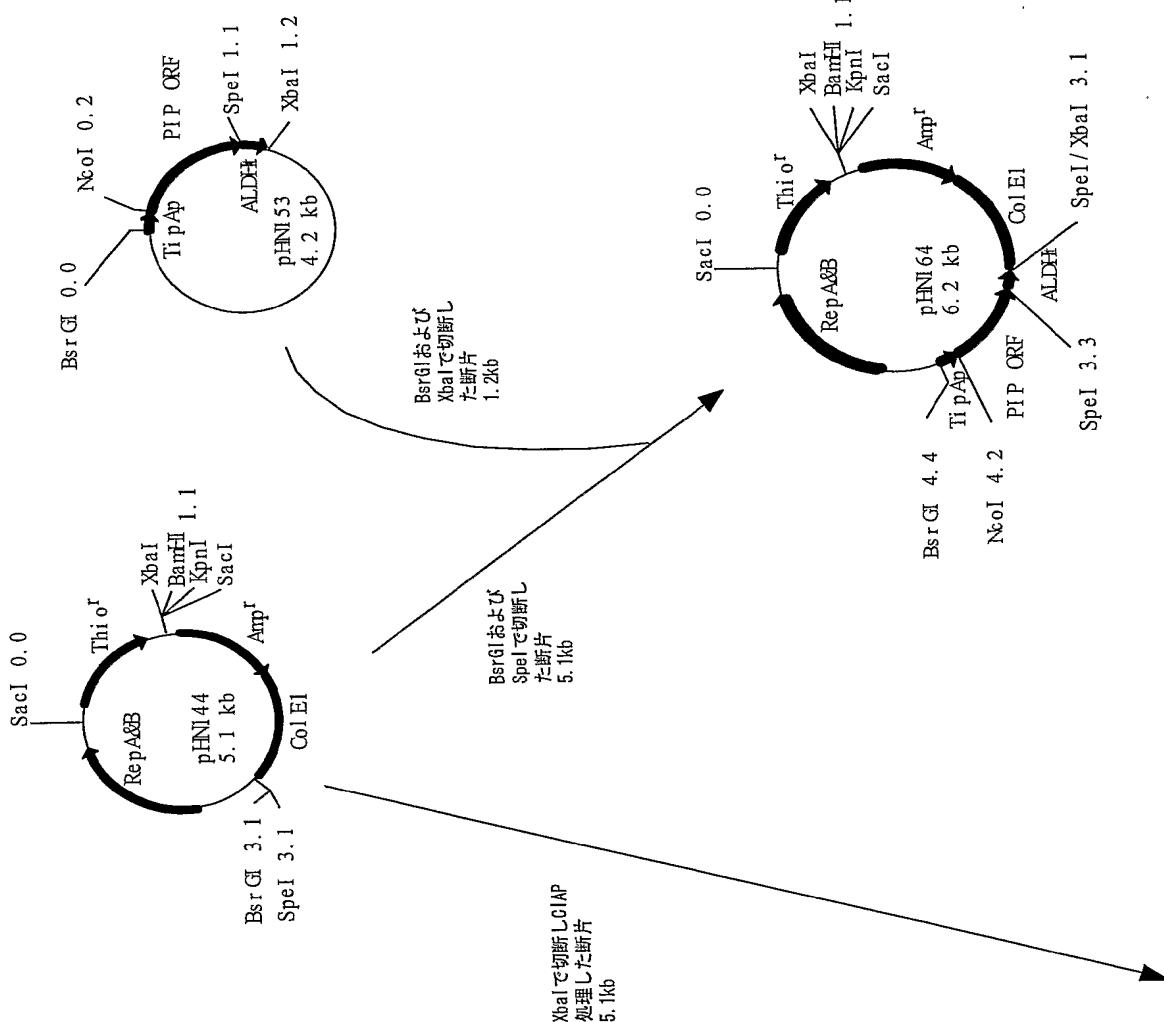


図 1 1



WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

四 1 1

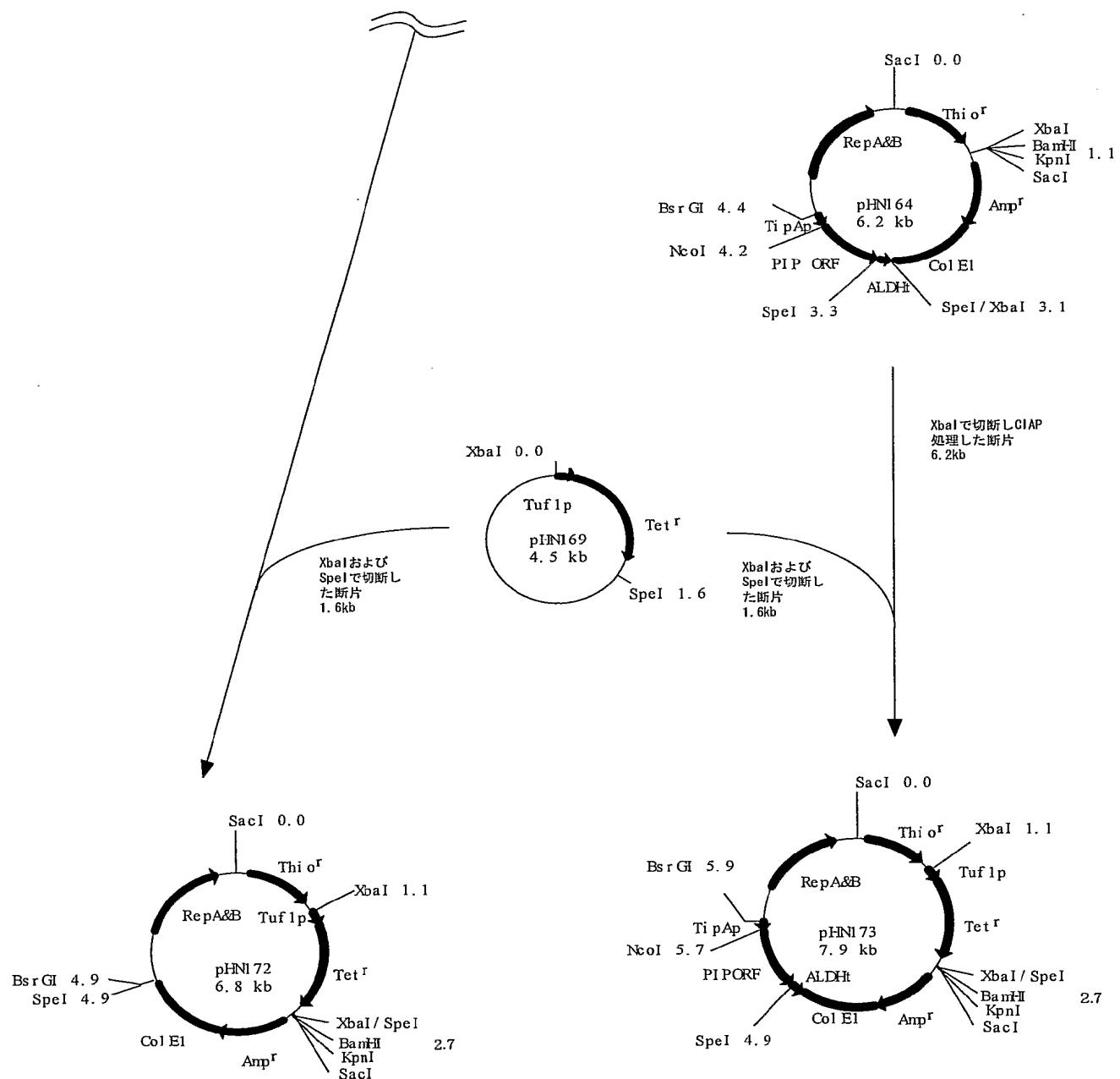


図12

活性 チオストレブトン (+/-チオストレブトン) (ユニット)	培養温度 (°C)	培養容積 (μl)	R _{erythropolis} φ形質転換に用いた プラスミド	Inducer cassette			Expression cassette		
				ALDHp	TipA	TipAp	PIP	ORF	ALDHt
+	-	16/0.5	4°C	5	pHN170	+	+	+	-
-	0.1/0.2	4°C	5	pHN173	-	-	-	-	-
+	0.1/0.1	4°C	5	pHN172	-	-	-	-	-
-	241/4	30°C	0.5	pHN170	+	+	+	+	-
+	0.9/0.6	30°C	0.5	pHN173	-	-	-	-	-
-	0.3/0.3	30°C	0.5	pHN172	-	-	-	-	-

図 1 3

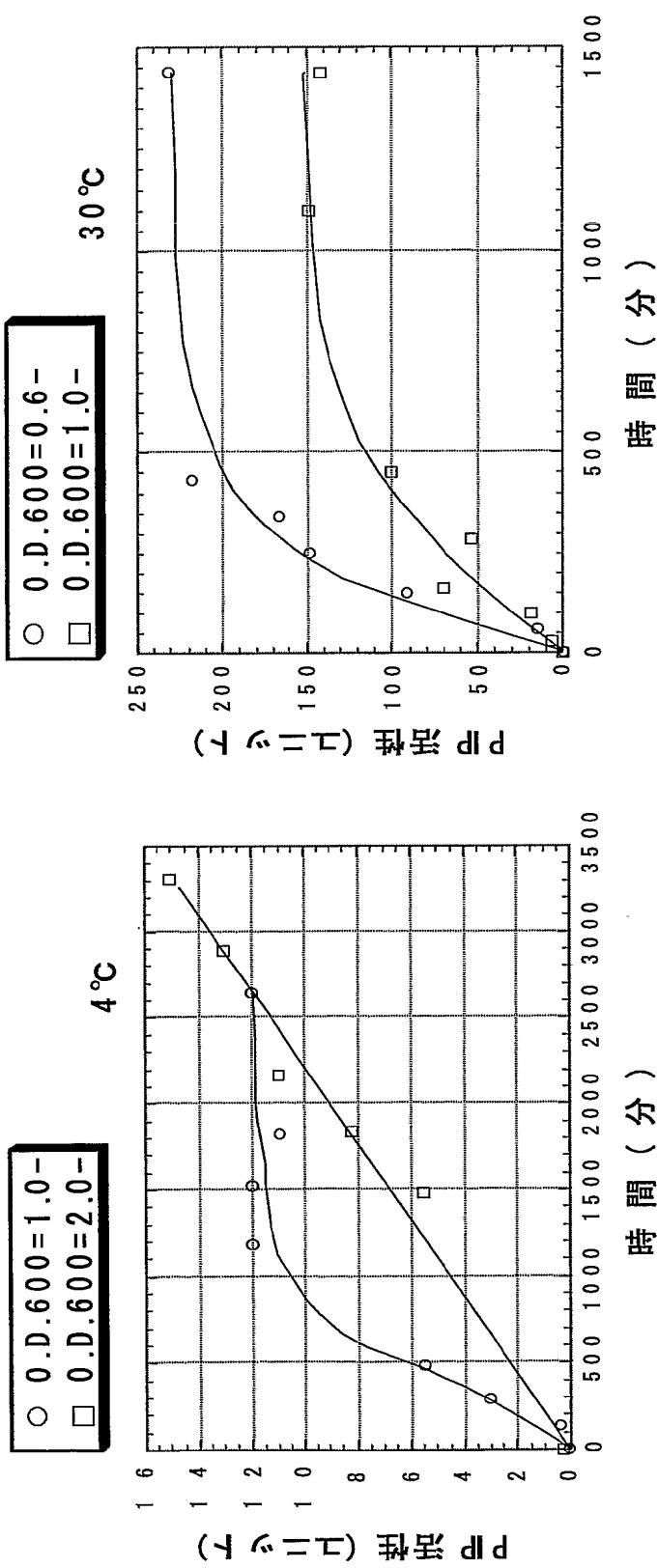


図 14

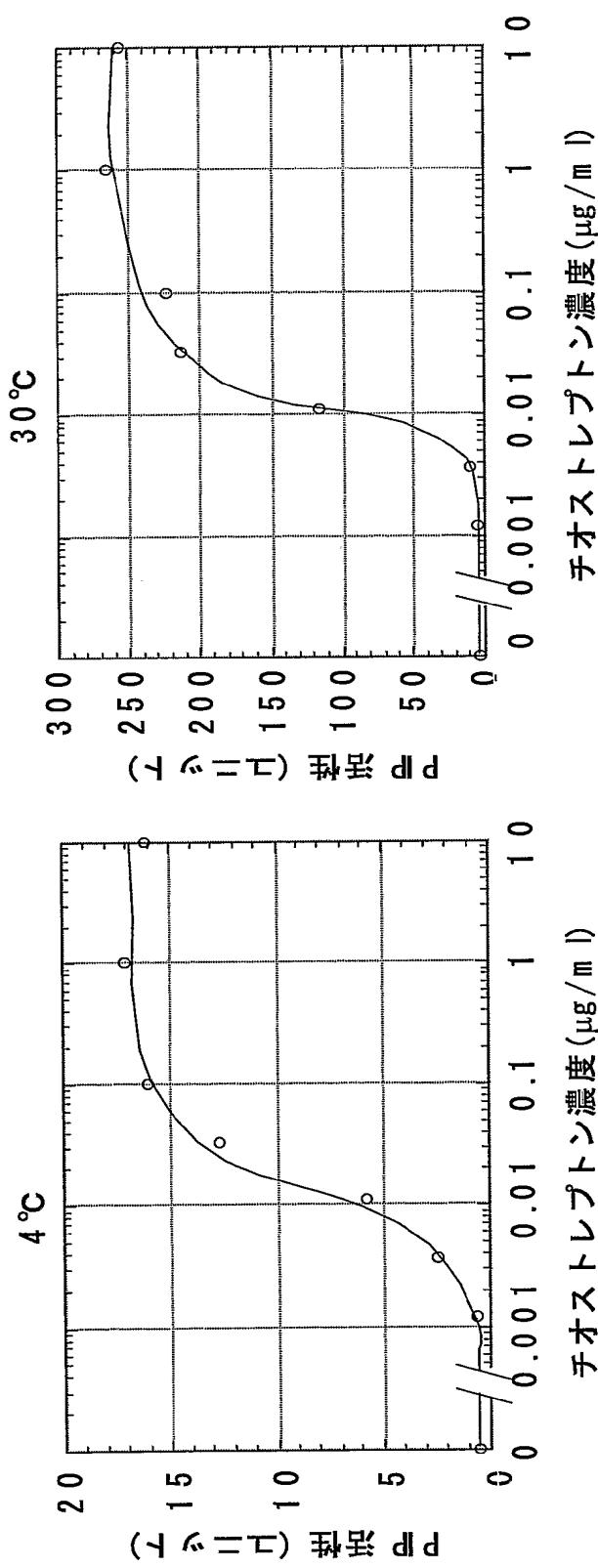
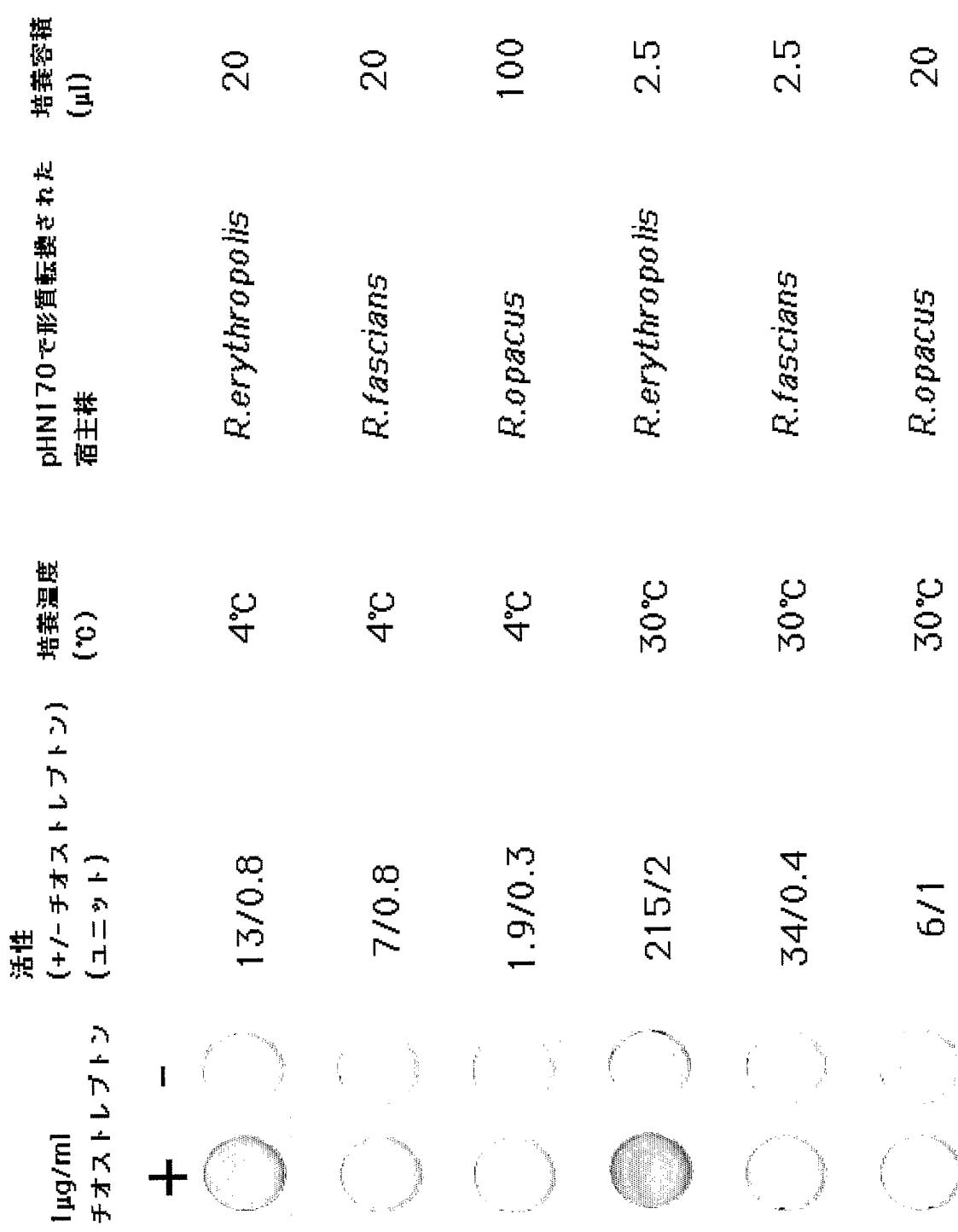


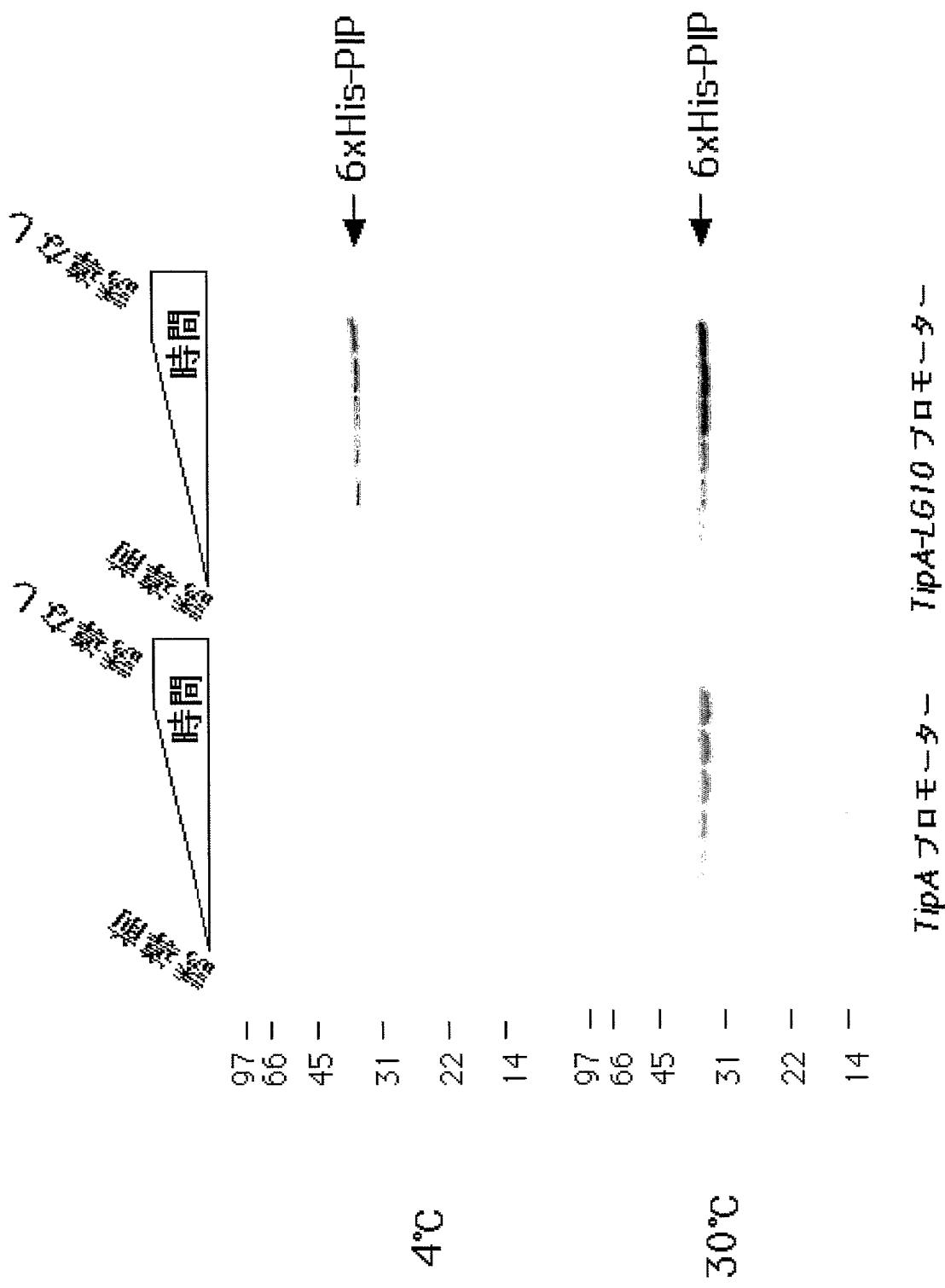
図15



WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

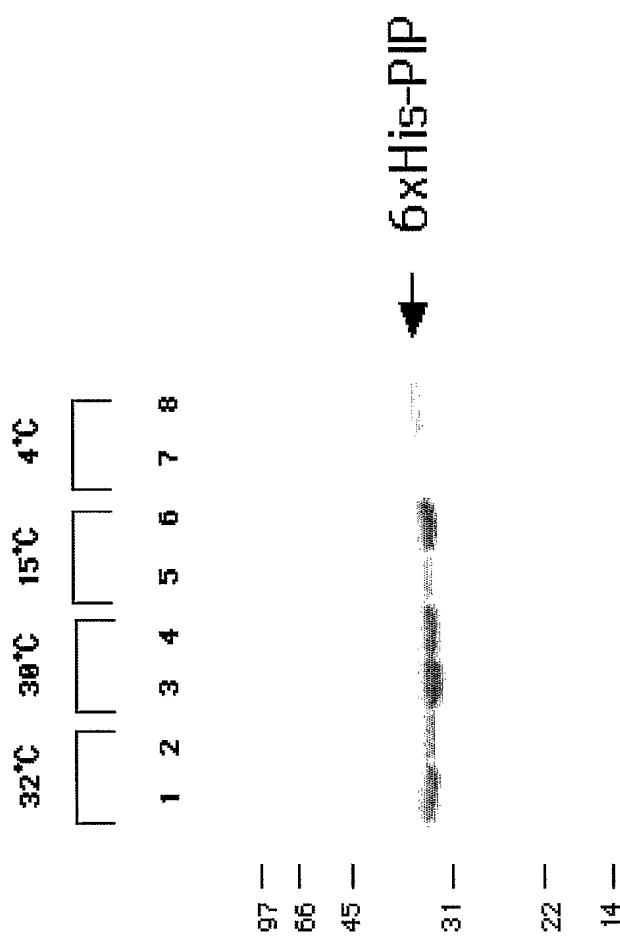
図 16



WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

图 17



WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

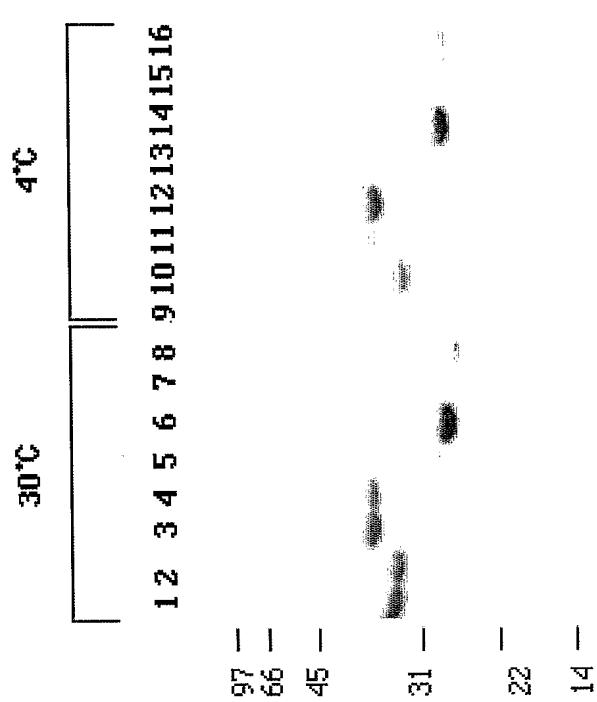


图 18

図 19

温度	レポーター	WT	LG10	倍率 (LG10/WT)
30°C	PIP	11	6.3	0.57
	AtPIP	11	4.6	0.39
	GFP	1.1	10	9.1
	GST	0.16	1.3	8.1
4°C	PIP	0.29	2.6	8.9
	AtPIP	0.13	2.9	22
	GFP	<0.01	3.9	>390
	GST	<0.01	1.3	>130

四 20

プラスミド名	分類	GenBank 受入番号	種類	数
	機能上既知タンパク質 (複数とれたもの)			6
LE20	Serum amyloid A (Saa1)	M11131		6
L113	NADH dehydrogenase 1 α 4	BC011114		2
LE59	Pantotenate kinase 1 β	AF200357		2
LE94	Retinol binding protein 4 (RBP4)	AK008765		2
LE98	Major urinary protein 4 like	BC019965		2
LE287	Histidine-rich glycoprotein	NM_053176		2
	機能上既知タンパク質 (複数とれなかつたもの)			24
L3	Cytochrome b5 like	AK002426		1
LE2	Fibrinogen A alpha	BC005467		1
LE3	Clustering	NM_013492		1
LE9	Splicing factor 3b subunit 1 155kDa	NM_031179		1
LE12	Haptoglobin	NM_017370		1
LE18	Peroxiredoxin 4	BC019578		1
LE82	Inter-alpha-trypsin inhibitor Heavy Chain 2	NM_010582		1
LE87	RIKEN130000F09, Highly similar to VIP36	NM_025828		1
LE95	Serum albumin	AJ011413		1
LE125	Arylacetate deacetylase	BC019999		1
LE137	New cDNA, Highly similar to UDP-Glycosyltransferase	-		1
LE156	RIKEN1300017J02, Highly similar to Transferrin	AK005035		1
LE171	Phosphatidylinositol 3-kinase	NM_008839		1
LE178	Protein kinase C receptor (RACK1) like	D29802		1
LE204	EGF receptor	AF275367		1
LE247	Retinoic acid receptor responsive protein TIG2	AK002298		1
LE251	Insulin-like growth factor IA	X04480		1
LE280	Transferrin	BC022986		1
LE295	Apolipoprotein A-V	NM_080434		1
LE305	Fatty Acid Binding Protein 1 (FABP1)	BC009812		1
LE354	Retinoblastoma binding protein 7 (Rbbp7)	NM_009031		1
LE357	Zinc fingers and homeoboxes protein 1 (Zhx1)	NM_009572		1
LE416	Tumor differentially expressed 1 like (Tde1l)	NM_019760		1
LE421	RIKEN130006C19, Highly similar to OSTSTT3	AK018758		1
	機能上未知タンパク質			4
LE25	IMAGE:4239007, DUF92 like membrane Protein?	BC016895		1
LE51	New cDNA, No homology	-		1
LE119	IMAGE:3489640, Bone marrow stromal protein like?	BC008532		1
LE123	RIKEN1500015G18, No homology	NM_025439		1
	小計			34
	他のタンパク質 (ORF外または重要でないタンパク質)			382
	総計			426

図 2 1

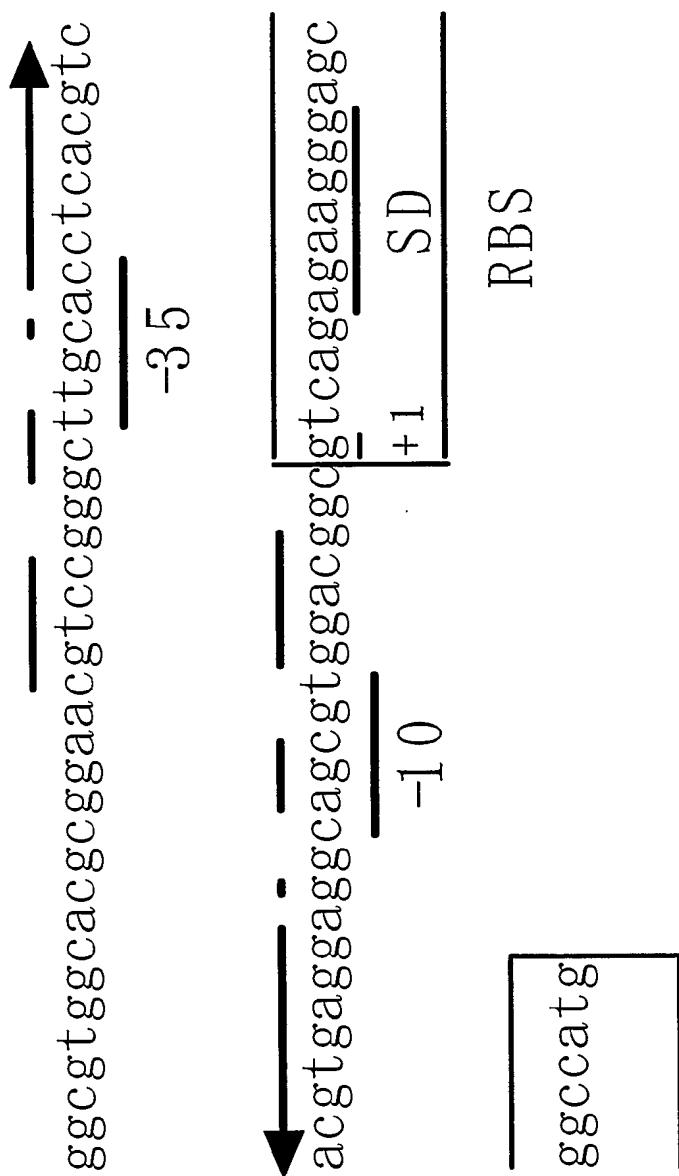
カテゴリー	タンパク質	6xHisタグ	推定分子量	<i>R. erythropolis</i>				<i>E. coli</i> 30°C
				プラスミド名	Sup/Ppt	30°C	4°C	
スクリーニングにより分離したタンパク質	Saa1 NADH4	N N	12(14) 9	pHN205 pHN206	0.4/1 N.D./0.2	- +	0.08/2 N.D./0.2	pHN193 pHN195
	Cytochrome b51 LE123	N N	15 19(21)	pHN208 pHN287	0.2/8 0.04/0.08	+- +	0.5/4 0.03/0.06	pHN199 pHN276
	Transferin Apoa5	N N	75(77) 39(41)	pHN289 pHN288	0.2/0.5 3/8	+- +-	0.06/0.2 2/4	pHN277 pHN281
	Pank Peroxiredoxin4	N N	42 27(31)					pHN279 pHN278
	TFL	N	75(77)					pHN280
不溶性プロテアーゼ	Cathepsin D Prothrombin Kallikrein6	C C C	43(45) 30(70) 26(29)	pHN270 pHN271 pHN272	2/3 N.D./N.D. 0.3/0.3	+- +- +++	0.3/2 N.D./N.D. 0.3/2	pHN273 pHN275
	Dnase	N DLAD	36(33) 38(41)	pHN299 pHN284	N.D./N.D. N.D./N.D.	+- +-	N.D./N.D. N.D./N.D.	
細胞増殖阻害タンパク質	HMG-1 Kif1 Bax alpha	N N N	25 66 21	pHN285 pHN286 pHN217	4/0.2 N.D./0.08 N.D./N.D.	- - -	2/0.06 N.D./0.2 N.D./N.D.	pHN305 pHN306 pHN212
低温依存的に可溶化されるタンパク質	Glucokinase p37A	N C	52 38	pHN298 pHN291	4/2 4/0.2	++ +++	6/2 3/0.1	pHN306 pHN308
ポジティブコントロール	PIP LacZ	C N	33 120	pHN171	6/0.7	+++	3/0.3	pBAD/HisA/lacZ4/0.5

图 2 2

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

cgccccggcttggggggccggacggccacggcggcggctcac



WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

图 2 3



WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> A novel expression vector suitable for the expression at low temperature

<130> PH-1849-PCT

<140>

<141>

<150> JP 2002/235008

<151> 2002-08-12

<160> 113

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN1

<400> 1

cagagctcgt caggtggcac ttttc

25

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN2

<400> 2

gttgtacaac tagtcgtgcc agctgcatta

30

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN120

<400> 3

gctgtacacc cgagaagctc ccagcg

26

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN121

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

<400> 4

cgaggactttt gaacgagagt tggccgttg

29

<210> 5

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN122

<400> 5

tcagatctat cgtcatcgac tgcgatcagc ttgacgccc

39

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN123

<400> 6

acggatccctc cgctgaaatc tcgccgtgcc t

31

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

〈220〉

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN130

<400> 7

cttcatatgc ggagctcgac cgcgcggg

28

〈210〉 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

〈220〉

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN131

<400> 8

atcgagtcgt tcaagggcgt cggc

24

〈210〉 9

〈211〉 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

〈220〉

<223> Description of Artificial Sequence:primer NEB1233

<400> 9

agcggataac aatttcacac agg

23

<210> 10

〈211〉 19

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN10

<400> 10

caccaggatg atcccccac

19

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN11

<400> 11

gacagtgaca tcaccagg

18

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NEB1224

<400> 12

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

cgccagggtt ttcccgatca cgac

24

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN40

<400> 13

atgagctact ccgtgggaca ggtg

24

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN41

<400> 14

tgcagatctt ccgtttcgac gtgacggag

29

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN42

<400> 15

cagtctagaa ttgatctcct cgaccg

26

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN43

<400> 16

tgcaaggctcc tatgtaaacg

20

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN55

<400> 17

cgcctgctcc acggccggcc

19

<210> 18

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN56

<400> 18

atggaggcac gcagcatg

18

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN57

<400> 19

cgcccccctcg gagtcggcgc

19

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN58

<400> 20

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

atggacgccc ccgaggac 18

<210> 21

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer sHN147

<400> 21

cgtgtacata tcgaggcggg ctccca 26

<210> 22

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer sHN39

<400> 22

atccatggcc gctcccttct ctgacgccgt c 31

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

<223> Description of Artificial Sequence:primer shN36

<400> 23

accatggatc aggaatgcattt

22

〈210〉 24

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer sHN37

<400> 24

ttactagttt attaatgatg atgatgatga tgcagggttt tcaggatgaa atccgaaag 59

<210> 25

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

〈220〉

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN6

〈400〉 25

cgtctagagt cccgctgagg cggcgtac

29

<210> 26

29

<212> DNA

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN9

<400> 26

ctactagtcg acccaccggc acccgtgag

29

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN141

<400> 27

aatctagagt aacgggctac tccgttaac

30

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN142

<400> 28

gggtcgacgg tcctcctgtg gagtggttct

30

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

<210> 29

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN145

<400> 29

gcactcgaga tgaaatctaa caatgcgctc atc 33

<210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN152

<400> 30

agacttagtcc tcaacgacag gagcacgatc 30

<210> 31

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

<223> Description of Artificial Sequence:primer T7

<400> 31

gtaatacgac tcactatagg gc

22

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN153

<400> 32

aatccacagg acgggtgtgg

20

<210> 33

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN154

<400> 33

ctctacgccg gacgcacatcg

19

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

<213> Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer T3

<400> 34

gcaatttaacc ctcactaaag gg

22

〈210〉 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN155

〈400〉 35

acgacgctct cccttatgcg

20

<210> 36

211 19

<212> DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

〈220〉

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN156

<400> 36

ccgatgccct tgagagcct

19

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

<210> 37

〈211〉 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN110

<400> 37

aaccatggta tatctcccttc ttaaagttaa acaaattat ttcttagacgc cgtccacgct 60
gcctcct 67

〈210〉 38

〈211〉 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

220

<223> Description of Artificial Sequence:primer NNc01

<400> 38

catggccac catcaccatc accatatggg aattctacgt agcggccgct gatccaagct 60
tagatctcga ggatgaa 77

<210> 39

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NNco2

<400> 39

ctagttcatc ctcgagatct aagcttggat ccgcggccgc tacgtagaat tcccatatgg 60
tcatggtgat ggtggcc 77

<210> 40

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CNco1

<400> 40

catggaaatt ctacgttagcg gccgcggatc caagcttaga tctcgaggac atcaccatca 60
ccatcaactga a 71

<210> 41

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CNco2

<400> 41

ctagttcagt gatggtgatg gtgatgtcct cgagatctaa gcttggatcc gcggccgcta 60
cgtagaattc c 71

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

<210> 42

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN159

<400> 42

tccatatgcg ctcccttctc tgacgccgt

29

<210> 43

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NNde1

<400> 43

tatggccat caccatcacc atcacgccat ggaaattcta cgttagcggcc gcggatccaa 60

gcttagatct cgaggatgaa 80

<210> 44

<211> 82

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer NNde2

<400> 44

ctagttcatc	ctcgagatct	aagcttggat	ccgcggccgc	tacgtagaat	tcccatggcg	60
tgtatggtgat	ggtgtatggcc	ca				82

<210> 45

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CNde1

<400> 45

tatggaaatt	ctacgttagcg	gccgcggatc	caagcttaga	tctcgaggac	atcaccatca	60
ccatcaactga	a					71

<210> 46

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer CNde2

<400> 46

ctagttcagt	gatggtgatg	gtgtatgtcct	cgagatctaa	gcttggatcc	gcggccgcata	60
------------	------------	-------------	------------	------------	-------------	----

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

cgtagaattc cca

73

〈210〉 47

〈211〉 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 Description of Artificial Sequence:primer sHN160

<400> 47

aacatatgtatctcccttc tttaaagttaa ac

32

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

220

<223> Description of Artificial Sequence:primer shN97

<400> 48

ataccatgga acctcatgaa gc

22

<210> 49

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN98

<400> 49

aactcgagat cccataagtg ctttcatctt 30

<210> 50

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN82

<400> 50

tactcatgtat gcatcaccat caccatc 27

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

pTrc99A·Cseq

<400> 51

cagaccgcctt ctgcgttctg 20

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN272

<400> 52

atccatggcc cctatactag gttattg

27

<210> 53

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN271

<400> 53

aactcgagtc aatccgattt tggaggatgg tcg

33

<210> 54

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN150

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

<400> 54

catggaaatt cagatctctc gaga

24

<210> 55

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN212

<400> 55

agcttctcga gagatctgaa ttcc

24

<210> 56

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

pBAD (Forward)

<400> 56

ctatgccata gcattttat cc

22

<210> 57

<211> 30

<212> DNA

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209****<213> Artificial Sequence****<220>****<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN166****<400> 57**

gccccatatggg gttttttca tttgttcacg 30

<210> 58**<211> 29****<212> DNA****<213> Artificial Sequence****<220>****<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN167****<400> 58**

aactcggatgc agtatttgc aggccgtcc 29

<210> 59**<211> 30****<212> DNA****<213> Artificial Sequence****<220>****<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN168****<400> 59**

gcctcgaggg gttttttca tttgttcacg 30

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

<210> 60

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN169

<400> 60

gaggtacctc agtatttgtc aggca

29

<210> 61

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN170

<400> 61

cacatatgct ccgccagatc ctgcgg

25

<210> 62

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN171

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

<400> 62

ttgaattctt agaagtctgg gccttcttc 30

<210> 63

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN172

<400> 63

ccctcgagat gctccgccag atcctcg 28

<210> 64

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN177

<400> 64

cccatatggc cgggcagtca gacaag 26

<210> 65

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN178

<400> 65

gagaattctc aatcttctgc catgttaggg

30

<210> 66

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

〈220〉

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN179

<400> 66

aactcgagat ggccgggcag tcagacaag

29

<210> 67

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

〈220〉

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN290

<400> 67

aacatatgaa caagagctt gaagatatcc

30

<210> 68

<211> 26

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN262

<400> 68

atgaattcat ggcaaccatc taactg

26

<210> 69

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN261

<400> 69

ttctcgagaa caagagctct gaagatatcc g

31

<210> 70

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN295

<400> 70

aacatatggc tgtccctgac aaaacggtc

29

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

<210> 71

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN266

<400> 71

ctaagcttt aatgtttgtg gaaagtgc

28

<210> 72

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN265

<400> 72

gtctcgaggt ccctgacaaa acggtaaat g

31

<210> 73

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN288

<400> 73

ttccatggca cggaagagcc tctggg

26

<210> 74

〈211〉 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

〈220〉

<223> Description of Artificial Sequence:primersHN268

<400> 74

ttgaattcca gacaatgagc tggaggg

27

〈210〉 75

29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

〈220〉

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN267

<400> 75

aactcgagcg gaagagcctc tgggactac

29

<210> 76

〈211〉 31

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN243

<400> 76

ctccatgggg attatcagaa tccctctgcg c

31

<210> 77

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN244

<400> 77

agctcgagag agtacgacag cattggcaaa gcc

33

<210> 78

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN245

<400> 78

aaccatgggc accaccgatg cggagttcca cacc

34

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

<210> 79

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN246

<400> 79

aactcgagat ccaaattgat caatgacttt ctgttatccac 40

<210> 80

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN247

<400> 80

aaccatggga attgttggag gatttaactg tgag 34

<210> 81

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN248

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

<400> 81

aactcgagag tcattttcag ccatagtttc tcttatcc 38

<210> 82

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN275

<400> 82

aacatatgct gaggctctgc tccttcaatg tgagg 35

<210> 83

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN307

<400> 83

ttctcgagcg tgatacctag gagcg 25

<210> 84

<211> 28

<212> DNA

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN277

<400> 84

ggccatgggg acaccagaaa tctcatgc 28

<210> 85

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN278

<400> 85

aagaattcac cgagtttact tacagaaccc 30

<210> 86

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN279R

<400> 86

aaccatgggc aaaggagatc ctaagaag 28

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

<210> 87

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN280

<400> 87

ttgaattcct gcgcctagaac caacttattc atc 33

<210> 88

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN314

<400> 88

aactcgaggg caaaggagat cctaagaag 29

<210> 89

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN283

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209****<400> 89**

gaccatggct cctgagcaat ggaaag

26

<210> 90**<211> 31****<212> DNA****<213> Artificial Sequence****<220>****<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN284****<400> 90**

ataagcttt aagggtcctc atccacgtga a

31

<210> 91**<211> 26****<212> DNA****<213> Artificial Sequence****<220>****<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN164****<400> 91**

aacatatgga cgggtccggg gagcag

26

<210> 92**<211> 30****<212> DNA****<213> Artificial Sequence**

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN194

<400> 92

aagaattctc agcccatctt cttccagatg 30

<210> 93

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN193

<400> 93

aactcgagat ggacgggtcc ggggagca 28

<210> 94

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN305

<400> 94

ctcatatggc tgtggatact acaagg 26

<210> 95

<211> 29

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN306

<400> 95

atctcgagga tttcactggc ccagcatgc

29

<210> 96

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN296

<400> 96

aactcggagcg tcggtatcct ttttgcgcgt

30

<210> 97

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN830

<400> 97

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209**

acccatgggc gacggtgctg gaaatcg

27

<210> 98

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN259

<400> 98

aactcgagat gaagcttgta aatggcagaa ag

32

<210> 99

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN260

<400> 99

aagaattcct ctactgtgta tcgggtcat

28

<210> 100

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

WO 2004/016792**PCT/JP2003/010209****<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN269****<400> 100**

aactcgagct gcaaggcttg gagagtgtatg 30

<210> 101**<211> 32****<212> DNA****<213> Artificial Sequence****<220>****<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN270****<400> 101**

gaggtacctt tcagtttagc ttgtcgaaat ac 32

<210> 102**<211> 31****<212> DNA****<213> Artificial Sequence****<220>****<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN263****<400> 102**

gcctcgagct tcctgagaag accatacgat g 31

<210> 103**<211> 30**

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN264

<400> 103

ctgaattctg ttaatattt atgaaatgtg

30

<210> 104

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer sHN343

<400> 104

aaactagttc agtgatggtg atggtgatgc tcgagagatc t

41

<210> 105

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer T7 Universal

<400> 105

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

taatacact cactataggg

20

<210> 106

<211> 8166

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-NH1

<400> 106

gagctcgacc ggcgggtcc cggacgggaa agagcgggaa gctttgccag agagcgacga 60
cttcccttgcgttgggtat tgccgggtcag ggcagccatc cgccatcgtc gcgttagggtg 120
tcacacccca ggaatcgctgt cactgaacac agcagccgtt aggacgacca tgactgagtt 180
ggacaccatc gcaaattccgtt ccgatccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240
gtcacgatcc aacataaaaga caacgttgcgtt cgaggacgtc gagccctca tgcacagcat 300
cgcgccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgc acgagtcctt ttccatctga 360
gttgctggat ctgtcgccgc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420
caaccagtttgc ttcaaggggg agcggaaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480
cccgccagg ttcggcgata tcgagccgc gcgtggggac gtcgtcggt tcgacgggt 540
gaagatcgic gggaaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600
gatcatctgt gtggacagtgc acatcaccag catcgccgc cggcgctcc aaagggccag 660
ccgagggttac gtcttctccc ttcccggtcgt tctctccgtt cgcgaggagg ccatcgccctt 720
cattcggac agcggtatgc agctgtatgc gctcaaggcg gatggcgaca ttccgtgaa 780
ggaactcggtt gacaatccgg atcggtggc ctgtcggttc ggcagcgaaa agggtggggcc 840
ttccgacactg ttcgaggagg cgcttccgc ctgggtttcc atccccatga tgagccagac 900
cgagtctctc aacgtttccg ttccctcgaa atcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960
tctcgccggcc aaccgataag cgccctgtt cctcgacgc tcggttccctc gacctcgatt 1020

cgtcagtgtat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgcttttaggc ttgacccgg 1200
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccggcacc cgggcttcc 1260
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcgcc accgtcaccc tggatgctgt 1380
aggcataggc ttggttatgc cggtactgccc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440
cagcatcgcc agtcaactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500
cgcacccgtt ctcggagcac tgtccgaccg ctgtggccgc cgcccagtc tgctcgcttc 1560
gctacttggaa gccactatcg actacgcgtat catggcgacc acaccgtcc tggatgttct 1620
ctacgcccga cgcacatcggtt ccggcatcac cggcgccaca ggtgcgggtt ctcggcccta 1680
tatcgccgac atcaccgtatg ggaaagatcg ggctcgccac ttggggctca tgagcgctt 1740
tttcggcgtt ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttggcgc ccatctcctt 1800
gcatgcacca ttcccttgcgg cggcggtgtt caacggcctc aacctactac tggctgttt 1860
cctaattgcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgtat cccttgagag ccttcaaccc 1920
agtcaagtcctt ttccgggtgg cgcggggcat gactatcgcc gccgcactta tgactgttt 1980
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040
ccgccttcgc tggagcgcga cgtatgtatgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgc 2100
cgccctcgct caagccttcg tcactggtcc cgccacccaa cgtttcggcgc agaagcaggc 2160
cattatcgcc ggcacggcgg ccgacgcgtt gggctacgtc ttgtggcgt tcgcgacgc 2220
aggctggatg gccttccccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgcccgc 2280
gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgaccat cagggacagc ttcaaggatc 2340
gctcgccgtt ctaccagcc taacttcgtat cattggaccg ctgatcgta cggcgattt 2400
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcacggatt gtggcgccg ccctataacct 2460
tgtctgcctc cccgcgttgc gtgcgggtgc atggagccgg gccacccgtc cctgaatgg 2520
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaaagaa ttggagccaa tcaattctt 2580
cgagagaactg tgaatgcgc aaccaaccct tggcagaaca tatccatcgc gtccgcac 2640
tccagcagcc gcacgcggcg catctcggtt agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcata 2700
atcgtgcctcc tgtcggtttag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

aatcatctg cgtttctcgc acgcaacgtt ctgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820
atcacacccc accggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccc 2940
gagtgacggt ggcacgctg caccactacg acgacatcg cctgctcgta ccgagcgagc 3000
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgcccaccc cgaccggctg cagcagatcc 3060
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgctcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgacccgg 3120
ccgcggaccc gcgcgcgcac ctgcgcgcac agcacgagct gctgtccgcc cggatcgga 3180
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atggaaatca 3240
acctcacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300
aggaggtccg ggaacgctgg gggAACACCG acgcctaccg ccagtccaa gagaagaccc 3360
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcacccggc 3420
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc cgcggactc cgagggggcg atggacgcgc 3480
ccgaggacca ccggcaggac atcgcccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgcgcaca 3600
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgcgcgc cggcacaccc 3660
cctgagcggt ggtcggtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcactccgg 3720
gccacgacca ccgcgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtaagg tggcacttt cggggaaatg 3840
tgcgcggaac ccctatTTt ttatTTTct aaatacattt aaatatgtat ccgctcatga 3900
gacaataacc ctgataaaatg cttaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960
atTTccgtgt cgcccttatt ccTTTTTt cggcattttg ctttcctgtt ttgcgtcacc 4020
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt gggtgacga gtgggttaca 4080
tcgaactgga tctcaacagc ggttaagatcc ttgagagttt tcgccccaa gaacgtttc 4140
caatgatgag cactttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatccgt attgacgcgc 4200
ggcaagagca actcggtcgc cgcatataact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgcgtccca 4320
taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380
agctaaccgc ttTTTgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440
cgagactgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500

caacaacgtt gcgc当地acta ttaactggcg aactacttac tcttagcttcc cgccaacaat 4560
taatagactg gatggaggcg gataaagtgc caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740
aggcaactat ggtatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgatttta aaacttcatt 4860
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggtatcttctt 4980
gagatccctt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaaacca ccgctaccag 5040
cggtggtttt tttgcccgtt caagagctac caactcttt tccgaaggta actggcttca 5100
gcagagcgc当地 gataccaaat actgttcttc tagtgttagcc gtatgttaggc caccacttca 5160
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaatt cctgttacca gtggctgctg 5220
ccagtgccgta taagtcgtt cttaccgggt tggactcaag acgatagttt ccggataagg 5280
cgcagcggc当地 gggctgaacg ggggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgc当地 cccgaaggga 5400
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccc当地 ctctgacttgc 5520
agcgtcgatt tttgtatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580
cggcctttt acggttcctg gcctttgct ggcctttgc tcacatgttgc ttccctgcgt 5640
tatcccctga ttctgtggat aaccgttata ccgccttgc gtgagctgat accgctcgcc 5700
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagttag tgagcgagga agcggaaagag cgc当地aaatc 5760
gcaaaccgccc tctccccgca cgttggccga ttcattaaatg cagctggcac gactagagtc 5820
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgccc ccagcggtgg tcaccaaccg gggtggaacg 5880
gcccggat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaaacct ccgtgtgttt gtgcagggtt 5940
cgcgtttgc agtccctcgc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gccc当地gggt 6000
cgactagttc atcctcgaga tctaagcttgc gatcccgccgc cgctacgttag aattccata 6060
tggtgatggat gatggtgccc catggccgct cccttctctg acgcccgtcca cgctgcctcc 6120
tcacgtgacg tgaggtgcaaa gccc当地ggacgt tccgcgtgcc acgcccgttag cc当地ccgcgtg 6180
ccgtcggc当地 cctcagcccg ggccggccgtg ggagcccgcc tcgatatgtt caccggagaa 6240

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

gctcccaagcg tcctcctggg ccgcgatact cgaccaccac gcacgcacac cgcaactaacg 6300
attcggccgg cgctcgattc ggccggcgct cgattcgcc ggcgctcgat tcggccggcg 6360
ctcgattcgg ccggcgctcg attcggccga gcagaagagt gaacaaccac cgaccacgct 6420
tccgctctgc gcgccgtacc cgacctacct cccgcagctc gaagcagctc ccgggagtag 6480
cgccgtactc acccgccctgt gctcaccatc caccgacgca aagcccaacc cgagcacacc 6540
tcttgcacca aggtgccgac cgtggcttc cgctcgcagg gttccagaag aaatcgaacg 6600
atccagcgcg gcaagggttca aaaagcaggg gttgggggg aggagggttt ggggggtgtc 6660
gccgggatac ctgatatggc tttttttgc tagtcgaat aattttccat atagcctcgg 6720
cgcgtcggac tcgaatagtt gatgtggcg ggcacagttt cccatgaaa tccgcaacgg 6780
ggggcgtgct gagcgatcgg caatggcgat atgcgggtt gttccgcac cggccgttcg 6840
cgacgaacaa cctccaacga ggtcagtacc ggatgagccg cgacgacgca ttggcaatgc 6900
gttacgtcga gcattcaccg cacgcgttgc tcggatctat cgtcatcgac tggatcacc 6960
ttgacgcccgc gatgcgcgca ttgcgcaac catccgacca tccggcccg aactgggtcg 7020
cacaatcgcc gtccggccgc gcacacatcg gatggtggtt cggcccaac cacgtgtgcc 7080
gcaccgacag cgcccgactg acgccactgc gctacgccc ccgcacatgaa accggcctca 7140
agatcagcgt cggcggcgat ttgcgtatg gcgggcaact gacaaaaaac ccgattcacc 7200
ccgattggga gacgatctac ggccggcca cccgtacac attgcggcag ctggccacca 7260
tccacacacc ccggcagatg ccgcgtcggc ccgatcggtt cgtggccctg gggcaacg 7320
tcaccatgtt cgacgccacc cggcgatggg cataccgca gtggtgccaa caccgaaacg 7380
gaaccggccg cgactgggac catctcgatcc tgcagcactg ccacgcgtc aacaccgagt 7440
tcacgacacc actgcgttc accgaagtac ggcgcaccgc gcaatccatc tccaaatgga 7500
tctggcgcaa ttgcaccgaa gaacagtacc gagccgaca agcgcacatc ggtcaaaaag 7560
gcggcaaggc aacgacactc gccaaacaag aagccgtccg aaacaatgca agaaagtacg 7620
acgaacatac gatgcgagag gcgattatct gatggcgga gccaatccatc cggtgcgcgc 7680
aaagatgacg gcagcagcag cagccgaaaa attcggtgcc tccactcgca caatccaacg 7740
cttgttgct gagccgcgtg acgattacct cggccgtgcg aaagctcgcc gtgacaaagc 7800
tgtcgagctg cggaaagcagg ggttgaagta ccgggaaatc ggcgaagcga tggactctc 7860
gaccgggatc gtcggccgt tactgcacga cgcccgagg cacggcgaga tticagcgaa 7920
ggatctgtcg gcgttaaccaa gtcagcgggt tgtcggttgc cggccggcg tcggcactcg 7980

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

gaccggccgg cgatgggtgt tctgcctctg gcgcagcgac agctaccgcc gaaggcctgt 8040
catcgaccgg ctgcgactga agtatgagca acgtcacagc ctgtgattgg atgatccgct 8100
cacgctcgac cgctacccgt tcagctgccc cccgctggc atgagcaacg gccaactctc 8160
gttcaa 8166

<210> 107

<211> 8169

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip-NH2

<400> 107

gagctcgacc ggcgggtcc cggacgggaa agagcgggaa gcttgccag agagcgacga 60
cttcccttg cgtgggtgat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgac gcgtagggtg 120
tcacacccca ggaatcggt cactgaacac agcagccgtt aggacgacca tgactgagtt 180
ggacaccatc gcaaattccgt ccgatccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgcgat cgaggacgtc gagccctca tgcacagcat 300
cgccggccgg gtggagttca tcgagggtcta cggcagcgtc agcagtcctt ttccatctga 360
gttgctggat ctgtcgggc ggcagaacat accggccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420
caaccagtttgc ttcaaggggg agcggaaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480
ccggccagg ttccggcata tcgcaagccg gcgtggggac gtcgtcggtc tcgacgggt 540
gaagatcgac gggaaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600
gatcatccgt gtggacatgt acatcaccag catcgccgtc cggcgctcc aaagggccag 660
ccgagggttac gtcttctccc ttccggcgt tctctccgt cgcgaggagg ccatcgccct 720
cattcggtac agcggatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca ttccgtgaa 780
ggaaactcggtt gacaatccgg atcggctggc ctgcgtgttc ggcagcgaaa agggtggggcc 840
ttccggacactg ttccggagg cgtctccgc ctgcgttcc atccccatga tgagccagac 900
cgagtctctc aacgtttccg ttccctcg aatcgccgtc cacgagagga tcgacaggaa 960

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

tctcgccggcc aaccgataag cgccitctgtt cctcgacgc tcggttccctc gacccgtt 1020
cgtcagtgtat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatacgag gtcaacggtc 1080
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgccc cttaacgcac tcgatgactc 1140
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgcttttaggc ttgacccgg 1200
agcctgcattt gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccgccacc cggccttcc 1260
agcaaagatc acctgtgcgc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcaccc tggatgctgt 1380
aggcataggc ttggttatgc cggtactgcc gggccttgc cgggatatcg tccattccga 1440
cagcatcgcc agtcaactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgcgc aatttctatg 1500
cgcacccgtt ctcggagcac tgtccgaccg ctggccgc cggccagtc tgctcgcttc 1560
gctacttggc gccactatcg actacgcgtat catggcgacc acacccgtcc tggattct 1620
ctacgcccga cgcacatcggtt ccggcatcac cggcgccaca ggtgcgttg ctggcgccata 1680
tatcgccgac atcaccgatg ggaaagatcg ggctcgccac ttctggctca tgagcgctt 1740
tttcggcgtt ggtatggtgg caggccccgt ggccggggga ctgttggcgcc ccatctcctt 1800
gcatgcacca ttcccttgcgg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tggctgctt 1860
cctaattgcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttggagag cctcaaccc 1920
agtcaagctcc ttccgggtgg cgcggggcat gactatcgatc gccgcactta tgactgtctt 1980
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040
ccgctttcgc tggagcgcga cgtatcgatc cctgtcgctt gcggatttcg gaatcttgc 2100
cgccctcgct caagccttcg tcactggtcc cggccacaaa cgtttcgccg agaagcaggc 2160
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgtt gggctacgtt ttgttggcgat tcgcgacgc 2220
aggctggatg gccttccccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgcccgc 2280
gttgcaggcc atgctgtccca ggcaggatgtt tgacgaccat cagggacagc ttcaaggatc 2340
gctcgccgtt cttaaccagcc taacttcgtat cattggaccg ctgtatcgatc cggcgattta 2400
tgccgcctcg gcgaggacat ggaacgggtt ggcatggattt gtggcgccgc ccctataacct 2460
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcgttgc atggagccgg gccacctcgat cctgaatgg 2520
agccggggc acctcgctaa cggattcacc actccaaagaa ttggagccaa tcaattcttgc 2580
cggagaactg tgaatgcgc aaccaaccct tggcagaaca tatccatcgatc gtccgcccac 2640
tccagcagcc gcacgcggcg catctcggtt agcgttgggtt cctggccacg ggtgcgcgtt 2700

atcgtgctcc tgcgttgag gactagaatt gatctccctcg accgccaatt gggcatctga 2760
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgtt ctgcacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820
atcacacccc accgggggtt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccc 2940
gagtgacggt ggcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgcccaccc cgaccggctg cagcagatcc 3060
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgctcg acgaggctgcg cgccctgctc gacgaccgg 3120
ccgcggaccc ggcgcgcac ctgcgcgcac agcacgagct gctgtccgcc cgatcggg 3180
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atggaaatca 3240
acctcacccc ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300
aggaggtccg ggaacgctgg gggAACACCG acgcctaccg ccagtccaa gagaagaccg 3360
cctcgtaac acaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctacccggc 3420
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccggccactc cgagggggcg atggacgccc 3480
ccgaggacca ccggcaggac atgcggcga accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgcccca 3600
agccgggcct cggccctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgcccgc cggcacaccc 3660
cctgagcggt ggtcggtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcactccgg 3720
gccacgacca ccggcgccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgccctccgc 3780
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtaagg tggactttt cggggaaatg 3840
tgcgcggaac ccctattttgt ttatTTTCT aaatacattt aaataatgtat ccgctcatga 3900
gacaataacc ctgataaaatg cttcaataat attaaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960
atTTCCGTGT cggcccttatt ccTTTTTG cggcatTTG cttcctgtt ttgtctacc 4020
cagaaacgtt ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggcacga gtgggttaca 4080
tcgaactgga tctcaacagc ggttaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgtttc 4140
caatgatgag cactttaaa gttctgctat gtggcgccgtt attatccgtt attgacgccc 4200
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgcgtccca 4320
taaccatgag tgataaacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380
agctaaccgc ttTTTGCAC aacatggggg atcatgttaac tcgccttgat cgttggaaac 4440

cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggaacaat 4560
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740
aggcaactat ggtatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980
gagatccctt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaaccac ccgctaccag 5040
cggtggttgc ttgcggat caagagctac caactcttt tccgaaggta actggcttca 5100
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagcc gtagtttaggc caccacttca 5160
agaactctgt agcaccgcct acataacctg ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg 5220
ccagtgccga taagtctgtt cttaccgggt tggactcaag acgatagttt ccggataagg 5280
cgcagcggtc gggctgaacg ggggttgcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460
ttccaggggg aaacgcctgg tatcttata gtcctgtcgg gtttcggccac ctctgacttg 5520
agcgtcgatt ttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580
cggcctttt acggttcctg gccttttgc ggcctttgc tcacatgtt tttctgcgt 5640
tatccccgtt ttcgtgttgc aaccgttata ccgccttgcgtt gtagctgtat accgctcgcc 5700
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagttagt tgagcgagga agcggaaagag cgcccaatac 5760
gcaaaccggcc tctccccggcg cgttggccga ttcatatgc cagctggcac gactagagtc 5820
ccgctgaggc ggcgttagcag gtcagccgcc ccagcgggtt tcaccaaccg ggggtggaaacg 5880
gcgcggat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaaacctt ccgtgtttt gtgcagggtt 5940
cgcgtgttgc agtccctcgcc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gcccgggtgggt 6000
cgactagttt atcctcgaga tctaagcttg gatcccgccgc cgctacgttag aattcccatg 6060
gcgtgtatgtt gatggtgatg gcccataatgc gtccttctt ctgacgcccgtt ccacgctgccc 6120
tcctcacgtt acgtgaggtt caagcccgga cgttccgcgtt gccacgcccgtt gagccgcccgc 6180

gtgccgtcgg ctccctcagc ccgggcggcc gtgggagccc gcctcgatat gtacacccga 6240
gaagctccca gcgtcctcct gggccgcgt actcgaccac cacgcacgca caccgcacta 6300
acgattcggc cggcgctcga ttccggccggc gctcgattcg gccggcgctc gattcggccg 6360
gcgctcgatt cgcccgccgc tcgattcggc cgagcagaag agtgaacaac caccgaccac 6420
gcttccgctc tgcgcgcccgt acccgaccta cctcccgctc ctcgaagcag ctcccggag 6480
taccggcgtt ctcacccgccc tgtgctcacc atccaccgac gcaaagccc acccgagcac 6540
accctttgca ccaaggtgcc gaccgtggct ttccgctcgc agggttccag aagaaatcga 6600
acgatccagc gccggcaaggt tcaaaaagca ggggttggtg gggaggaggt tttgggggt 6660
gtcgccggga tacctgatat ggctttgttt tgcgtagtcg aataatttc catatagcct 6720
cggcgctcg gactcgaata gttgatgtgg gcgggcacag ttgccccatg aaatccgcaa 6780
cggggggcgt gctgagcgt cggcaatggg cggatgcgtt gttgcgttccg caccggccgt 6840
tcgcgacgaa caacctccaa cgaggicagt accggatgag ccgcgacgac gcattggcaa 6900
tgcggtagt cgagcattca ccgcacgcgt tgctcgatc tatcgatc gactgcgatc 6960
acgttgacgc cgcgatgcgc gcattcgagc aaccatccga ccatccggcg ccgaactggg 7020
tcgcacaatc gccgtccggc cgccacaca tcggatggtg gctggcccc aaccacgtgt 7080
gccgcaccga cagcgcccgaa ctgacgcccac tgctcgatc ccaccgcata gaaaccggcc 7140
tcaagatcag cgtcgccggc gatttcgcgt atggcggca actgaccaaa aaccgcattc 7200
accccgattt ggagacgatc tacggcccg ccaccccgta cacattgcgg cagctggcca 7260
ccatccacac accccggcag atgcccgcgt ggcccgatcg ggccgtggc ctggccgc 7320
acgtcaccat gttcgacgcc acccgccgt gggcataccc gcagtggtgg caacaccgaa 7380
acggaaccgg ccgcgactgg gaccatctcg tcctgcagca ctgcccacgcc gtcaacaccg 7440
agttcacgac accactgccc ttccacgaa tacgcgcac cgcgcatacc atctccaaat 7500
ggatctggcg caatttcacc gaagaacagt accgagcccg acaagcgcata ctggtaaaa 7560
aaggcggcaa ggcaacgaca ctcgccaaac aagaagccgt ccgaaacaat gcaagaaagt 7620
acgacgaaca tacgatgcga gaggggattt tctgatggc ggagccaaaa atccggtgcg 7680
ccgaaagatg acggcagcag cagcagccga aaaattcggt gcctccactc gcacaatcca 7740
acgttgttt gctgagccgc gtgacgattt cctcgccgt gcgaaagctc gccgtgacaa 7800
agctgtcgag ctgcggaaagc aggggttggaa gtaccggaa atgcggaaag cgatgaaact 7860
ctcgaccggg atcgtcgccc gattactgca cgacgcccgc aggcacggcg agatttcagc 7920

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

ggaggatctg tcggcgtaac caagtacgcg gtttgtcggg ttccggccgg cgctcggcac 7980
tcggaccggc cggcggtatgg tttctgcct ctggcgacgc gtcagctacc gccgaaggcc 8040
tgtcatcgac cggcttcgac tgaagtatga gcaacgtcac agcctgtat tggatgatcc 8100
gctcacgctc gaccgctacc tttcagctg ccgcccgtg ggcatgagca acggccaact 8160
ctcgttcaa 8169

<210> 108

<211> 8160

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip·CH1

<400> 108

gagctcgacc ggcgggtcc cggacgggaa agagcgggaa gctttgccag agagcgacga 60
cttcccttgcgttggat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgatc gcgttagggtg 120
tcacacccca ggaatcgctt cactgaacac agcagccgtt aggacgacca tgactgagtt 180
ggacaccatc gcaaatccgtt ccgatccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240
gtcacgatcc aacataaaga caacgttgcgtt cgaggacgtc gagccctca tgcacagcat 300
cgccggccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgtc agcagtccctt ttccatctga 360
gttgctggat ctgtcgccgc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcg 420
caaccagttt tcaagggggg agcggaaaggc caagacattc ggcacatcgccc gcgtccctcg 480
cccgccagg ttcggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcggttc tcgacggggt 540
gaagatcgatc gggaaacatcg ggcgtatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgccgc cggcgtctcc aaaggccag 660
ccgaggttac gtttctccc ttccgtcgat tctctccgtt cgcgaggagg ccatcgccctt 720
cattcgccgc agcggtatgc agctgtatgc gctcaaggcg gatggcgaca ttccgtgaa 780
ggaactcggtt gacaatccgg atcggctggc cttgctgttc ggcagcgaaa agggtgggccc 840
ttccgacactt ttcgaggagg cgtttccgc ctgcgttcc atccccatga tgagccagac 900

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

cgagtctctc aacgtttccg tttccctcg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960
tctcgccggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcgacgc tcggttccctc gaccctcgatt 1020
cgtcagtgtat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttgaacgac tcgatgactc 1140
tagagtaacg ggctactccg ttaacggac cccgttctca cgcttttaggc ttgacccgg 1200
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccgccacc cgggctttcc 1260
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgat catcctcgcc accgtcaccc tggatgctgt 1380
aggcataggc ttggttatgc cggtactgcc gggcctcttg cgggatatcg tccattccga 1440
cagcatcgcc agtcaactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgcgc aatttctatg 1500
cgcacccgtt ctcggagcac tgtccgaccg ctttggccgc cgcccagtc tgctcgcttc 1560
gctacttgga gccactatcg actacgcgat catggcgacc acacccgtcc tggattct 1620
ctacgcccga cgcacatcgat ccggcatcac cggcgccaca ggtgcgggttg ctggcgcccta 1680
tatcgccgac atcaccgatg ggaaagatcg ggctcgccac ttctggctca tgagcgcttg 1740
tttcggcgtg ggtatggtgg cagggccgt ggccggggga ctgttggcgcc ccatctcctt 1800
gcatgcacca ttcccttgcgg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tggctgctt 1860
cctaattgcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgatg cccttgagag ccttcaaccc 1920
agtcaagctcc ttccgggtgg cgcgggcat gactatcgat cccgcactta tgactgtctt 1980
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040
ccgctttcgc tggagcgca cgtatcgatgg cctgtcgctt gcggatttcg gaatcttgca 2100
cgccctcgct caagccttcg tcactggatcc cgccacccaa cgtttggcg agaagcaggc 2160
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgt gggctacgtc ttgttggcg tgcgcacgcg 2220
aggctggatg gccttccccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgcccgc 2280
gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgaccat cagggacagc ttcaaggatc 2340
gctcgccgct cttaaccagcc taacttcgtat cattggaccg ctgatcgatca cggcgattta 2400
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcattggatt tggcgccg ccctataacct 2460
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcgttgc atggagccgg gccacctcgat cctgaatgg 2520
agccggcgcc acctcgctaa cggattcacc actccaaagaa ttggagccaa tcaatttttgc 2580
cggagaactg tgaatgcgc aaccacccct tggcagaaca tatccatcgatc gtccgcac 2640

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

tccagcagcc gcacgcggcg catctcgcc agcggtgggt cctggccacg ggtgcgcacg 2700
atcgtgctcc tgtcggttag gactagaatt gatctccctcg accgccaatt gggcatctga 2760
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgta ctgcacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820
atcacacccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccc 2940
gagtgacggt ggcacgctg caccactacg acgacatcg cctgctcgta ccgagcgagc 3000
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgcccaccc cgaccggctg cagcagatcc 3060
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgctcg acgagggtcgc cgccctgctc gacgacccgg 3120
ccgcggaccc ggcgcgcac ctgcgcgcac agcacgagct gctgtccgc cggatcgga 3180
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atggaaatca 3240
acctcacccc ggaggagaag ttcgagggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300
aggaggtccg ggaacgctgg gggAACACCG acgcctaccg ccagtccaaag gagaagaccg 3360
cctcgtacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcacccggc 3420
gcttcgtcgcc cctgatggac gcgggtgagc cccggactc cgagggggcg atggacgccc 3480
ccgaggacca ccggcagggc atcgcccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgccgcca 3600
agccgggcct cggccctac atgcgcgacg cgatccctcgca acacgcccgc cggcacaccc 3660
cctgagcggt ggtcggtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcactccgg 3720
gccacgacca ccggcggtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcactttt cggggaaatg 3840
tgcgcggaac ccctatttgt ttatTTTCT aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 3900
gacaataacc ctgataaaatg cttaataat attaaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960
atTTCCGTGT cggccattttt ccctttttt cggcatttt ctttcctgtt ttgtctacc 4020
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgtcg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4080
tcgaactgga tctcaacagc ggtaaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140
caatgatgag cactttaaa gttctgttat gtggcgccgt attatccgt attgacgccc 4200
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgcgtcc 4320
taaccatgag tgataaacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380

agctaaccgc tttttgcac aacatgggg atcatgtAAC tcgccttgat cgttggAAC 4440
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cgccaacaat 4560
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttcgg 4620
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcg ggtatcattg 4680
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740
aggcaactat ggtatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatactta gattgattt aaacttcatt 4860
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920
aacgtgagtt ttgcgtccac tgaggcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980
gagatccctt tttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaaacca ccgctaccag 5040
cggtggttt gttgccggat caagagctac caactcttt tccgaaggta actggcttca 5100
gcagagcgcA gataccaaat actgttcttc tagtgttagcc gtagtttaggc caccacttca 5160
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaatt cctgttacca gtggctgctg 5220
ccagtgccga taagtctgtt cttaccgggt tggactcaag acgatagttt ccggataagg 5280
cgcagcgtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgcct cccgaaggga 5400
gaaaggcggA caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgcccac ctctgacttg 5520
agcgtcgatt ttgtgtatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580
cgccctttt acggttcctg gccttttgc ggccttttgc tcacatgttc ttccctgcgt 5640
tatccctga ttctgtggat aaccgttata ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5700
gcagccgaac gaccgagcgc agcgtgatcg tgagcgagga agcggaaagag cgcccaatac 5760
gcaaaccgccc tctccccgcg cgttggccga ttcatTAATG cagctggcac gactagagtc 5820
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgc ccagcggtgg tcaccaaccg gggtggaacg 5880
gcgcggat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgtt gtgcagggtt 5940
cgctgttgc agtccctcgc accggcaccc gcagcgaggg gtcacgggt gcccgggggt 6000
cgactagttc agtgtatggtg atggtgatgt cctcgagatc taagcttgaa tccgcggccg 6060
ctacgtagaa ttcccatggc cgctcccttc tctgacgccc tccacgctgc ctccctcacgt 6120

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

gacgtgaggt gcaagcccg acgttccgcg tgccacgccc tgagccgccc cgtgccgtcg 6180
gctccctcag cccgggcggc cgtgggagcc cgcctcgata tgtacacccg agaagctccc 6240
agcgtcctcc tggccgcga tactcgacca ccacgcacgc acaccgcact aacgattcgg 6300
ccggcgctcg attcgccgg cgctcgattc ggccggcgct cgattcgcc ggcgctcgat 6360
tcggccggcg ctcgattcgg ccgagcagaa gagtgaacaa ccaccgacca cgcttccgct 6420
ctgcgcgccc taccgcacct acctccgcg gctcgaagca gctcccggga gtaccgcccgt 6480
actcaccgcg ctgtgctcac catccaccga cgcaaagccc aacccgagca cacccttgc 6540
accaagggtgc cgaccgtggc tttccgctcg cagggttcca gaagaaatcg aacgatccag 6600
cgccggcaagg ttcaaaaagc aggggttggc ggggaggagg ttttgggggg tgcgcggg 6660
atacctgata tggctttgtt ttgcgttagtc gaataattt ccatatagcc tcggcgcgtc 6720
ggactcgaat agttgtatgtg ggcgggcaca gttgccccat gaaatccgca acggggggcg 6780
tgctgagcga tcggcaatgg gcggatgcgg ttttgcttcc gcaccggccg ttgcgcacga 6840
acaacctcca acgaggtcag taccggatga gccgcgacga cgcatggca atgcgttacg 6900
tcgagcattc accgcacgcg ttgcgtggat ctatgtcat cgactgcgt cacgttgcacg 6960
ccgcgatgca cgcattcgag caaccatccg accatccggc gccgaactgg gtcgcacaat 7020
cgccgtccgg ccgcgcacac atcggatgtt ggctcgcccc caaccacgtg tgccgcaccg 7080
acagcgcccg actgacgcca ctgcgttacg cccaccgcattt cgaaaccggc ctcaagatca 7140
gcgtcgccgg cgatttcgcg tatggcgggc aactgaccaa aaacccgattt caccggattt 7200
gggagacgat ctacggcccg gccacccgtt acacattgcg gcagctggcc accatccaca 7260
caccggca gatgccgcgt cggccgcattt gggccgtggg cctggccgc aacgtcacca 7320
tgttcgacgc caccggcga tggcataacc cgcagtggc gcaacaccga aacggaaccg 7380
gccgcgactt ggaccatctc gtcctgcagc actgccacgc cgtcaacacc gagttcacga 7440
caccactgcc gttcaccgaa gtacgcgcca ccgcgcataatc catctccaaa tggatctggc 7500
gcaatttcac cgaagaacag taccgagccc gacaaggcga tctcggtcaa aaaggcggca 7560
aggcaacgac actcgccaaa caagaagccg tccgaaacaa tgcaagaaag tacgacgaac 7620
atacgatgcg agaggcgatt atctgatggg cggagccaaa aatccggtgc gccgaaagat 7680
gacggcagca gcagcagccg aaaaattcgg tgcctccact cgcacaatcc aacgcgttgc 7740
tgctgagccg cgtgacgatt acctcgcccg tgcgaaagct cgccgtgaca aagctgtcga 7800
gctgcggaag caggggttga agtaccggaa aatcgccgaa gcgttggaaac tctcgaccgg 7860

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

gatcgtcgcc cgattactgc acgacgccc caggcacggc gagatttcag cggaggatct 7920
gtcggcgtaa ccaagtcagc gggttgtcgg gttccggccg gcgctcgca ctggaccgg 7980
ccggcggatg gtgttctgcc tctggcgac cgtcagctac cgccgaaggc ctgtcatcga 8040
ccggcttcga ctgaagtatg agcaacgtca cagcctgtga ttggatgatc cgctcacgct 8100
cgaccgctac ctgtttagt gccgcccgt gggcatgagc aacggccaac tctcgttcaa 8160

<210> 109

<211> 8160

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector pTip·CH2

<400> 109

gagctcgacc ggcgcgggtcc cggacgggaa agagcgggaa gctttgccag agagcgacga 60
cttcccccttg cgttgggtat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgatc gcgttaggtg 120
tcacacccca ggaatcgctt cactgaacac agcagccgtt aggacgacca tgactgagtt 180
ggacaccatc gcaaataatccgtt ccgtatccgc ggtgcagcgg atcatcgatc tcaccaagcc 240
gtcacgatcc aacataaaaga caacgtttagt cgaggacgtc gagccctca tgcacagcat 300
cgccggccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgtc agcagtccctt ttccatctga 360
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420
caaccaggatg ttcaaggggg agcggaaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480
cccgccagg ttccggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgatc tcgacgggt 540
gaagatcgatc gggaaacatcg ggcgtatgtt acgcacgtc ctcgcgtcg ggcgtcggtt 600
gatcatcctg gtggacagtgc acatcaccag catcgccgtc cggcgtctcc aaaggccag 660
ccggaggatcgtc gtcttctccc ttcccgatcgt tctctccgtt cgcgaggagg ccatcgccctt 720
cattcggttgc agcggatgc agctgtatgc gctcaaggcg gatggcgaca ttccgtgaa 780
ggaaactcggtt gacaatccgg atcggctggc ctgtcgatc ggcagcgaaa aggggtggcc 840

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

ttccgacctg ttcgaggagg cgtctccgc ctcggttcc atccccatga tgagccagac 900
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960
tctcgccggcc aaccgataag cgccctctgtt cctcggacgc tcggttccctc gacctcgatt 1020
cgtcagtgtat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatacgag gtcaacggtc 1080
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc cttaaacgac tcgatgactc 1140
tagagtaacg ggctactccg ttaacggac cccgtttctca cgctttaggc ttgacccgg 1200
agcctgcatg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccgccacc cgggctttcc 1260
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgt catcctcggc accgtcaccc tggatgtgt 1380
aggcataggc ttggttatgc cggtactgcc gggcctcttgc cgggatatcg tccattccga 1440
cagcatcgcc agtcaactatg gcgtgctgct agcgctatat gcgttgatgc aatttctatg 1500
cgcacccgtt ctggagcac tgtccgaccg ctggccgc cgcccaagtcc tgctcgcttc 1560
gctacttggc gccactatcg actacgcgtat catggcggacc acacccgtcc tggattct 1620
ctacgcccga cgcacatcggtt ccggcatcac cggccggccaca ggtgcgggttg ctggcgcccta 1680
tatcgccgac atcaccgatg ggaaagatcg ggctcgccac ttctggctca tgagcgcttg 1740
tttcggcgtt ggtatggtgg caggccccgtt ggccggggga ctgttggcgc ccatctcctt 1800
gcatgcacca ttccattgcgg cggcggtgtt caacggcctc aacctactac tggctgtctt 1860
cctaattgcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgatg ccctttagag cctcaaccc 1920
agtcaagctcc ttccgggtgg cgcggggcat gactatcgatc gccgcactta tgactgtctt 1980
ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040
ccgctttcgc tggagcgca cgtatcgatgg cctgtcgctt gcggatttcg gaatcttgca 2100
cgccctcgct caaggccctcg tcactgggtcc cgccacccaa cggttggcgc agaaggcaggc 2160
cattatcgcc ggcattggcgg ccgacgcgtt gggctacgtc ttgttggcgt tcgcgacgcg 2220
aggctggatg gccttccccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgccgc 2280
gttgcaggcc atgcgttcca ggcaggtaga tgacgaccat cagggacagc ttcaaggatc 2340
gctcgccggctt ctaccagcc taacttcgtat cattggaccg ctgtatcgatc cgccgattta 2400
tgccgcctcg gcgaggacat ggaacgggtt ggcatggatt ttaggcggccg ccctataacct 2460
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcgggtgc atggagccgg gccacctcga cctgaatgg 2520
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

cgggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcgc gtccgccatc 2640
tccagcagcc gcacgcggcg catctgggc agcggtgggt cctggccacg ggtgcgcatg 2700
atcgtgctcc tgcgttgag gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760
gaatcatctg cgittctcgc acgcaacgt a cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820
atcacacccc accgggggtt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccc 2940
gagtgacggt gcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 3000
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgcccaccc t cgaccggctg cagcagatcc 3060
tgttctaccg ggagctggc ttcccgctcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccgg 3120
ccgcggaccc ggcgcgcac ctgcggccgc agcacgagct gctgtccgcc cgatcgaaa 3180
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atggaaatca 3240
acctcacccc ggaggagaag ttcgaggctt tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300
aggaggtccg ggaacgctgg gggAACACCG acgcctaccg ccagtccaa gagaagaccg 3360
cctcgtacac caaggaggac tggcagcga tccaggacga ggccgacgag ctcacccggc 3420
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc cccggactc cgagggggcg atggacgccc 3480
ccgaggacca ccggcagggc atgcggcga accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgcccaca 3600
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgcccgc cgacacaccc 3660
cctgagcggt ggtcgtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcactccgg 3720
gccacgacca ccggcgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtaagg tggcacttt cggggaaatg 3840
tgcgcggaac ccctatttgt ttattttct aaatacattc aaatatgtat ccgcctatga 3900
gacaataacc ctgataaaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960
atttccgtgt cgcccttatt ccctttttg cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc 4020
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggcacga gtgggttaca 4080
tcgaactgga tctcaacagc ggtaaagatcc ttgagagtt tcgcggcga gaacgtttc 4140
caatgatgag cactttaaa gttctgctat gtggcgcgtt attatccgt attgacgccc 4200
ggcaagagca actcggtcgc cgcatcact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260
cagtacacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgcgtccca 4320

taaccatgag tgataaacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380
agctaaccgc tttttgcac aacatgggg atcatgtaac tcgccttgat cgttggaaac 4440
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cgccaacaat 4560
taatagactg gatggaggcg gataaaagtig caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4620
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4680
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740
aggcaactat ggtatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattt aaacttcatt 4860
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980
gagatccctt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgc当地 aaaaaaaacca ccgctaccag 5040
cggtggttgc ttgc当地ggat caagagctac caactcttt tccgaaggta actggcttca 5100
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagcc gtagtttaggc caccacttca 5160
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaatt cctgttacca gtggctgctg 5220
ccagtgccga taagtctgt ctaccgggt tggactcaag acgatagttt ccggataagg 5280
cgcagcggtc gggctgaacg ggggttgcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgc当地cgtt cccgaaggaa 5400
gaaaggcggaa caggtatccg gtaagcggca gggtc当地ggac aggagagcgc acgagggagc 5460
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttgc当地ccac ctctgacttg 5520
agcgtcgatt ttgtgatgc tcgtcagggg ggc当地ggacct atggaaaaac gccagcaacg 5580
cggccctttt acggttccctg gcctttgc ggc当地ggc当地 tcacatgttc ttccctgcgt 5640
tatccctga ttctgtggat aaccgtatta cc当地ccctt当地 gtagactgat accgctcgcc 5700
gcagccgaac gaccgagcgc agc当地gtcag tgagc当地ggaa agc当地ggaaagag cgc当地aaatac 5760
gcaaaccgccc tctccccgcg cgttggccga tt当地attaatg cagctggcac gactagagtc 5820
ccgctgaggc ggc当地gtcag gtc当地ggcc cc当地gggtgg tcaccaaccg gggtggaaacg 5880
gc当地ccggat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaaacct cc当地gtgttt gtgc当地gggtt 5940
cgc当地gttgc agtccctcgc accggcaccc gcagc当地ggg gctcacgggt gccggtgggt 6000
cgactagttc agtgc当地gggtg atggtgc当地gtg cctcgagatc taagctt当地 gtc当地ggccg 6060

ctacgtagaa ttccccatatg cgctcccttc tctgacgccc tccacgctgc ctccctcacgt 6120
gacgtgaggt gcaagcccg acgttccgctg tgccacgccc tgagccgccc cgtgccgtcg 6180
gctccctcag cccgggcggc cgtgggagcc cgcctcgata tgtacacccg agaagctccc 6240
agcgtcctcc tgggcccgcga tactcgacca ccacgcacgc acaccgcaact aacgattcgg 6300
ccggcgctcg attcggccgg cgctcgattc ggccggcgct cgattcggcc ggcgtcgat 6360
tcggccggcg ctcgattcgg ccgagcagaa gagtgaacaa ccaccgacca cgcttccgct 6420
ctgcgcgccc tacccgaccc acctcccgca gctcgaagca gctcccgga gtaccgcccgt 6480
actcaccgcg ctgtgctcac catccaccga cgcaaagccc aacccgagca cacctcttgc 6540
accaagggtgc cgaccgtggc tttccgctcg cagggttcca gaagaaatcg aacgatccag 6600
cgcgcaagg ttcaaaaagc aggggttgtt ggggaggagg ttttgggggg tgcgcgcggg 6660
atacctgata tggctttgtt ttgcgtagtc gaataattt ccatatagcc tcggcgctc 6720
ggactcgaat agttgtatgt ggcgggcaca gttgcggcat gaaatccgca acggggggcg 6780
tgctgagcga tcggcaatgg gcggatgcgg ttttgcgttc gcaccggccg ttgcgcacga 6840
acaacctcca acgaggtcag taccggatga gccgcgacga cgcatggca atgcgttacg 6900
tcgagcattc accgcacgcg ttgcgtcgat ctatcgcat cgactgcgt cacgttgcacg 6960
ccgcgatgcg cgcattcgag caaccatccg accatccgc gccgaactgg gtgcacaat 7020
cgccgtccgg cgcgcacac atcggttgtt ggctcgcccc caaccacgtg tgccgcacccg 7080
acagcgcccg actgacgcca ctgcgtacg cccaccgcatt cgaaaccggc ctcaagatca 7140
gcgtcgccgg cgatttcgctg tatggcgggc aactgaccaaa aaaccgattt caccggattt 7200
gggagacgat ctacggcccg gccacccgtt acacattgcg gcagctggcc accatccaca 7260
caccggca gatgccgcgt cggcccgatc gggccgtggg cctggccgc aacgtcacca 7320
tgttcgacgc caccggcga tggcatacc cgcagtggtg gcaacaccga aacgaaaccg 7380
gccgcgactg ggaccatctc gtcctgcagc actgccacgc cgtcaacacc gagttcacga 7440
caccactgcc gttcaccgaa gtacgcgcca ccgcgcatac catctccaaa tggatctggc 7500
gcaatttcac cgaagaacag taccgagccc gacaagcgca tctcggtcaa aaaggcggca 7560
aggcaacgac actcgccaaa caagaagccg tccgaaacaa tgcaagaaag tacgacgaac 7620
atacgtgctg agaggcgatt atctgtatggg cggagccaaa aatccgggtgc gccgaaagat 7680
gacggcagca gcagcagccg aaaaattcgg tgcctccact cgcacaatcc aacgcttgcgtt 7740
tgctgagccg cgtgacgatt acctcgccgg tgcaagact cgccgtgaca aagctgtcga 7800

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

gctgcggaag caggggttga agtaccggga aatcgccgaa gcgatggaac tctgaccgg 7860
gatcgtcggc cgattactgc acgacgcccgg caggcacggc gagatttcag cggaggatct 7920
gtcggcgtaa ccaagtcagc gggttgtcgg gttccggccg gcgctcgga ctggaccgg 7980
ccggcggatg gtgttctgcc tctggcgcag cgtcagctac cgccgaaggc ctgtcatcga 8040
ccggcttcga ctgaagtatg agcaacgtca cagcctgtga ttggatgatc cgctcacgct 8100
cgaccgctac ctgtttagt gccgcccgt gggcatgagc aacggccaac tctcgtaaa 8160

<210> 110

<211> 8189

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector

pTip·LNH1

<400> 110

gagctcgacc ggcgcgggtcc cggacgggga agagcgggga gctttgccag agagcgacga 60
cttcccccttg cgttgggtat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgatc gcgttagggtg 120
tcacacccca ggaatcgctt cactgaacac agcagccgtt aggacgacca tgactgagtt 180
ggacaccatc gcaaatccgtt ccgtatccgc ggtgcagcgg atcatcgatc tcaccaagcc 240
gtcacgatcc aacataaaga caacgtttagt cgaggacgtc gagccctca tgacagcat 300
cgccggccggg gtggagttca tcgaggatcta cggcagcgtc agcagtccctt ttccatctga 360
gttgctggat ctgtcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420
caaccagtttgc ttcaaggggg agcggaaaggc caagacattc ggcatcgccc gcgtccctcg 480
cccgccagg ttccggcgata tcgctggccg gcgtggggac gtcgtcgatc tcgacgggt 540
gaagatcgatc gggaaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 600
gatcatccctg gtggacagtgc acatcaccag catcgccggac cggcgtctcc aaaggccag 660
ccggaggatc acgtttctccc ttccggatcgatc tctctccggatc cgcgaggagg ccatcgccctt 720

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

cattcgggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca tttccgtgaa 780
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc ctigctgttc ggcagcgaaa agggtgtggcc 840
ttccgaccctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctcggtttcc atccccatga tgagccagac 900
cgagtctctc aacgtttccg tttccctcgg aatcgcgctg cacgagagga tcgacaggaa 960
tctcgccggcc aaccgataag cgcctctgtt cctcggaacgc tcggttcctc gacctcgatt 1020
cgtcagtgtat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgccc ctgaacgc tcgatgactc 1140
tagagtaacg ggctactccg ttaacggac cccgttctca cgctttaggc ttgacccgg 1200
agcctgcattg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc ccccgccacc cggccttcc 1260
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgat catcctcggc accgtcaccc tggatgctgt 1380
aggcataggc ttggttatgc cggtactgcc gggccttgc cgggatatcg tccattccga 1440
cagcatcgcc agtcaatcgat gcgtgctgt agcgctatat gcgttgcgc aatttctatg 1500
cgcacccgtt ctcggagcac tgtccgaccg ctggggccgc cgcccagtc tgctcgcttc 1560
gctacttggat gccaactatcg actacgcgtat catggcgacc acacccgtcc tggttgcgt 1620
ctacgcccggat cgcatcgatgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcgggttgc ctggcgccata 1680
tatcgccgac atcaccgtatgg gggaaatcg ggctcgccac ttggggctca tgagcgcttgc 1740
tttcggcgtt ggtatggatgg caggccccgt ggccggggga ctgttggcgcc ccatctccctt 1800
gcatgcacca ttccctgcgg cggcggtgtt caacggccctc aacctactac tgggtgcgtt 1860
cctaattgcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgtat cccttgagag ccttcaaccc 1920
agtcaagctcc ttccggatgg cgcggggcat gactatcgatc ggcgcactta tgactgtctt 1980
ctttatcatg caactcgatg gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040
ccgctttcgc tggagcgcga cgtatgtatgg cctgtcgctt gcggattatcg gaatcttgca 2100
cgccctcgctt caaggccatcg tcactggatcc cgccacccaa cgtttcgccgc agaaggcaggc 2160
cattatcgcc ggcattggcg ccgacgcgtt gggctacgtc ttgttggcgatcg tcgcgcacgc 2220
aggctggatg gccttccccat ttagtatttc tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgcccgc 2280
gttgcaggcc atgctgttcca ggcaggatgtt tgacgaccat cagggacagc ttcaaggatc 2340
gctcgccggctt ctaccatcgat cattggaccgtt ctgatcgatca cggcgattttt 2400
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcattggattt gtaggcggccgc ccctataacctt 2460

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcgtgc atggagccgg gccacctcga cctgaatgga 2520
agccggcgcc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttgc 2580
cggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcgc gtccgcccattc 2640
tccagcagcc gcacgcggcg catctgggc agcggttgggt cctggccacg ggtgcgcattg 2700
atcgtgctcc tgtcggtttag gactagaatt gatctccctcg accgccaattt gggcatctga 2760
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgtt cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820
atcacacccc accggggggtt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgttggg acaggtggcc ggcttcgcgc 2940
gagtgacggtt ggcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgtt ccgagcgcagc 3000
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgcccgcattt cgaccggctg cagcagatcc 3060
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgctcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccgg 3120
ccgcggaccc ggcgcgcgcac ctgcgcgcgc accacgagct gctgtccgc cggatcgaaa 3180
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgtatgga ggcacgcagc atggaaatca 3240
acctcaccctt ggaggagaag ttcgaggtct tcggcgactt cgaccccgac cagtaggagg 3300
aggaggtccg ggaacgctgg ggaaacaccg acgcctaccg ccagtccaaag gagaagaccg 3360
cctcgtaacac caaggaggac tggcagcga tccaggacga ggccgacgag ctacccggc 3420
gcttcgtcgc cctgtatggac gcgggttgcg ccgcgcactc cgagggggcg atggacgcgc 3480
ccgaggacca ccggcaggac atcgcccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgcac aacgtttcac gcgaaacatc gacgcgcaca 3600
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgcac cgatcctcgc caacgcgcgc cggcacaccc 3660
cctgagcggtt ggtcggtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcactccgg 3720
gccacgacca ccgcgcgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3780
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtaagg tggcactttt cggggaaatg 3840
tgcgcggaac ccctattttt ttatttttctt aaatacatttca aataatgtat ccgcctatga 3900
gacaataacc ctgataaaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960
atttccgtgtt cgcccttattt cccttttttgc cggcattttgc cttccgtttt tttgttcacc 4020
cagaaacgctt ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagttt gggtgacgaa gtgggttaca 4080
tcgaactgga tctcaacagc ggttaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140
caatgatgag cacttttaaa gttctgtat gtggcgccgtt attatccgtt attgacgcgc 4200

ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcc 4320
taaccatgag tgataaacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380
agctaaccgc tttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440
cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4500
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagttcc cggcaacaat 4560
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tcgcgcctcg gcccttccgg 4620
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcatg 4680
cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740
aggcaactat ggtatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 4860
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980
gagatcctt tttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag 5040
cggtggtttgc tttgccggat caagagctac caactcttt tccgaaggtt actggcttca 5100
gcagagcgcgca gataccaaat actgttcttc tagttagcc gtagttaggc caccacttca 5160
agaactctgt agcaccgcct acataccctcg ctctgctaatt cctgttacca gtggctgctg 5220
ccagttggcga taagtcgtgt cttaaccgggt tggactcaag acgatagttt ccggataagg 5280
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5340
acaccgaact gagataccctt cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgcctt cccgaaggaa 5400
gaaaggcggta caggtatccg gtaagcggca gggtcggaaac aggagagcgc acgagggagc 5460
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520
agcgtcgatt ttgtgtatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580
cggccctttt acggttccctg gccttttgc ggccttttgc tcacatgttc ttccctgcgt 5640
tatccctgtt ttctgtggat aaccgttata ccgccttta gttgagctgat accgcgtcgcc 5700
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcggagga agcggaaagag cgcccaatac 5760
gcaaaccggcc tctcccccgcg cgttggccga ttcatatgt cagctggcac gactagagtc 5820
ccgctgaggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcggtgg tcaccaaccg gggtggaacg 5880
gcgcggat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacctt ccgtgtgtt gtgcagggtt 5940

cgctgttgtgc agtccctcgc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gccggtggt 6000
cgactagttc atccctcgaga tctaagcttg gatccgcggc cgctacgtag aattccata 6060
tggtgatggt gatggtggcc catggtatat ctcccttctta aagttaaaca aaattatttc 6120
tagacgccgt ccacgctgcc tcctcacgtg acgtgaggtg caagcccgga cgttccgcgt 6180
gccacgccgt gagccgccgc gtgccgtcgg ctccctcagc ccggcgccgc gtgggagccc 6240
gcctcgatat gtacacccga gaagctccca gcgtccctcct gggccgcgt actcgaccac 6300
cacgcacgca caccgcacta acgattcggc cggcgctcga ttcggccggc gctcgattcg 6360
gccggcgctc gattcggccg ggcgtcgatt cggccggcgc tcgattcggc cgagcagaag 6420
agtgaacaac caccgaccac gcttccgctc tgcgcgccgt acccgaccta cctccgcag 6480
ctcgaagcag ctcccgaggag taccggcgt a ctcacccgccc tgcgtcacc atccaccgac 6540
gcaaagccca acccgagcac acctcttgca ccaagggtgcc gaccgtggct ttccgctcgc 6600
agggttccag aagaaatcga acgatccagc gcggcaaggt tcaaaaagca ggggttgggt 6660
gggaggaggt ttggggggt gtcgccggga tacctgatat ggctttgtt tgcgtagtcg 6720
aataattttc catatagcct cggcgctcg gactcgaata gttgatgtgg gcgggcacag 6780
ttgccccatg aaatccgcaa cggggggcgt gctgagcgat cggcaatggg cggatgcgg 6840
gttgcttccg caccggccgt tcgcgacgaa caacctccaa cgaggtcagt accggatgag 6900
ccgcgacgac gcattggcaa tgcgtacgt cgagcattca cgcacgcgt tgctcgatc 6960
tatcgtcatc gactgcgatc acgttgacgc cgcgtgcgc gcattcgagc aaccatccga 7020
ccatccggcg ccgaactggg tcgcacaatc gccgtccggc cgcgcacaca tcggatgggt 7080
gctcgcccc aaccacgtgt gccgcaccga cagcgcccgat gtcgtacgc tgcgtacgc 7140
ccaccgcac tcaagatcag cgtcgccggc gatttcggcgt atggcgggca 7200
actgaccaaa aacccgattt accccgattt ggagacgatc tacggcccg ccacccgtt 7260
cacattgcgg cagctggcca ccatccacac accccggcag atgcgcgtc gggccgatcg 7320
ggccgtggc ctggggccca acgtcaccat gttcgacgcc accccggcgat gggcatacc 7380
gcagtggtgg caacaccgaa acggaaccgg ccgcgactgg gaccatctcg tcctgcagca 7440
ctgccacgcc gtcaacaccg agttcacgac accactgcgt ttcaccgaag tacgcgccac 7500
cgcgcaatcc atctccaaat ggatctggcg caatttcacc gaagaacagt accgagcccg 7560
acaagcgcac ctcggtcaaa aaggcggcaa ggcaacgaca ctgccaaacc aagaagccgt 7620
ccgaaacaat gcaagaaagt acgacgaaca tacgatgcga gaggcgattt tctgatgggc 7680

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

ggagccaaa atccggtgcg ccgaaagatg acggcagcag cagcagccga aaaattcggt 7740
gcctccactc gcacaatcca acgcgtgttt gctgagccgc gtgacgatta cctcggccgt 7800
gcgaaagctc gccgtgacaa agctgtcgag ctgcggaagc aggggttcaa gtaccggaa 7860
atcgccgaag cgatggaact ctgcaccggg atcggtcgcc gattactgca cgacgcccgc 7920
aggcacggcg agatttcagc ggaggatctg tcggcgtaac caagttagcg gtttgtcggt 7980
ttccggccgg cgctcgac tcggaccggc cggcggtatgg tggctgcct ctggcgac 8040
gtcagctacc gccgaaggcc tgtcatcgac cggcttcgac tgaagtatga gcaacgtcac 8100
agcctgtgat tggatgatcc gctcacgctc gaccgcttacc tggctagctg ccgcccgtg 8160
ggcatgagca acggccaaact ctgcgttcaa 8189

<210> 111

<211> 8183

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector

pTip·LNH2

<400> 111

gagctcgacc ggcgggtcc cggacgggaa agagcgggaa gctttgccag agagcgacga 60
cttcccccttg cgttgggtat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgat gcgttaggggt 120
tcacacccca ggaatcggt cactgaacac agcagccgtt aggacgacca tgactgagtt 180
ggacaccatc gcaaattccgt ccgatccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240
gtcacgatcc aacataaaga caacgtttagt cgaggacgtc gagcccccata tgcacagcat 300
cgccggccggg gtggagttca tcgaggatcta cggcagcgtc agcagtccctt ttccatctga 360
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggatccgc ctcatcgact cctcgatgt 420
caaccagttt ttcagggggg agcggaaaggc caagacattc ggcattcccc gcgtccctcg 480
ccggccagg ttccggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcgatc tcgacgggt 540

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

gaagatcgtc ggaaacatcg gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcctcg gagcgtcg 600
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgccgac cggcgtctcc aaagggccag 660
ccgaggtiac gtcttcctcc ttcccgctgt tctctccggt cgcgaggagg ccatcgccct 720
cattcggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca ttccgtgaa 780
ggaactcg 840
gacaatccgg atcggctggc ctigctgttc ggcagcgaaa agggtgggcc 840
ttccgacctg ttcgaggagg cgtctccgc ctgggtttcc atccccatga tgagccagac 900
cgagtcttc aacgtttccg ttccctcgg aatcgctcg cacgagagga tcgacaggaa 960
tctcgcc 1020
aaccgataag cgccctgtt cctcgacgc tcggttccctc gacctcgatt 1020
cgtcagtgtat gatcacctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1080
gtggccggg cggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgcc ctgaacgac tcgatgactc 1140
tagagtaacg ggctactccg ttaacggac cccgttctca cgctttaggc ttgacccgg 1200
agcctgcattt gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaatgc cccggcacc cgggctttcc 1260
agcaaagatc accggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgat catcctcggc accgtcaccc tggatgtgt 1380
aggcataggc ttggttatgc cggtactgcc gggccttttgc cggatatcg tccattccga 1440
cagcatcgcc agtcaatcgat gcgtgtgtc agcgctatgc gcgttgatgc aatttctatg 1500
cgcacccgtt ctggagcac tgtccgaccg ctggccgc cgccttgc tgctcgcttc 1560
gctacttggc gccactatcg actacgcgtat catggcggacc acacccgtcc tgtggattct 1620
ctacgcccga cgcacatcgat ccggcatcac cggcgccaca ggtgcgggttgc ctggcgctta 1680
tatcgccgac atcaccgtatggc gggaaagatcg ggctcgccac ttgggtctca tgagcgctt 1740
tttggcgatggc ggtatggatggc caggccccgt ggccggggga ctgttggcgcc ccatctcctt 1800
gcatgcacca ttcccttgcgg cggcggtgtc caacggcctc aacctactac tgggtgtctt 1860
cctaattgcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgtat cccttggagag ccttcaaccc 1920
agtcaatcgatcc ttccggatggc cgcggggcat gactatcgatc gccgcactta tgactgtctt 1980
ctttatcatg caactcgatg gacaggtgtcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040
ccgctttcgatggc cgtatgtatggc cctgtcgctt gcggatttcg gaatcttgca 2100
cgccctcgatggc caaggccatcg tcactggatcc cgccacccaa cgtttcgccg agaaggcaggc 2160
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgt gggctacgtc ttgctggatggc tgcgcacgcg 2220
aggctggatg gccttccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgcccgc 2280

gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgaccat cagggacagc ttcaaggatc 2340
gctcgccgct cttaccagcc taacttcgtat cattggaccg ctgatcgatca cggcgatata 2400
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgcgc ccctataacct 2460
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacactcgat cctgaatggat 2520
agccggcgcc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580
cgagagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcgat gcgcgcac 2640
tccagcagcc gcacgcggcg catctcgcc agcggtgggt cctggccacg ggtgcgcatt 2700
atcgtgctcc tgtcggttgcg gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2760
gaatcatctg cgtttctcgat acgcaacgtt ctgtcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820
atcacacccc accgggggggt gggatttgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgcgc 2940
gagtgcacggt ggcacgcgtt caccactacg acgacatcggt cctgcgtcgat ccgagcgagc 3000
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgcccggaccc cgaccggctg cagcagatcc 3060
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgctcg acgaggatcgat cgccctcgatc gacgaccgg 3120
ccgcggaccc ggcgcgcac ctgcgcgcgc agcacgagct gctgtccgc cggatcgaa 3180
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatggat ggcacgcagc atggaaatca 3240
acccaccccc ggaggagaag ttcgaggatct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300
aggaggatccg ggaacgcgtgg ggaaacaccg acgcctaccg ccagtccaa gagaagaccg 3360
cctcgatcac caaggaggac tggcagcgatcc tccaggacga ggccgacgatc ctacccggc 3420
gcttcgtcgat cctgtatggac gcgggtgagc ccgcgcactc cgaggggggcg atggacgcgc 3480
ccgaggacca ccggcaggac atcgcccgatcc accactacgat ctgcgggtac gagatgcaca 3540
cctgcctggc cgagatgtac gtgtccgcgcg aacgtttcac gcgaaacatc gacgcgcac 3600
agccgggcct cggccctac atgcgcgcac cgatccgtcgat caacgcgcgc cggcacacccc 3660
cctgagcggt ggtcggtggcc cgggtctccc gcccggtctc accccacggc tcactccgg 3720
gccacgcacca ccggcgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgc 3780
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgatcagg tggcactttt cggggaaatg 3840
tgcgcggaaac ccctatgtt ttattttctt aaatacattt aaatatgtat ccgcgtatga 3900
gacaataacc ctgataaatg cttaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3960
atttccgtgt cgcccttatt ccctttttt cggcatttttgc ctttcgtttt tttgcgtacc 4020

cagaaaacgct ggtgaaaagta aaagatgctg aagatcagtt gggtgacga gtgggttaca 4080
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 4140
caatgatgag cactttaaa gttctgctat gtggcgccgt attatccgtt attgacgccc 4200
ggcaagagca actcggtcgc cgcatataact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260
cagtacacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320
taaccatgag tgataaacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380
agctaaccgc tttttgcac aacatgggg atcatgtaac tcgccttgat cgtggaaac 4440
cgaggctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcgt gttagcaatgg 4500
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cgccaacaat 4560
taatagactg gateggaggcg gataaagttt caggaccact tctgcgtcgt gcccittccgg 4620
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattt 4680
cagcaactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740
aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4800
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgatttta aaacttcatt 4860
ttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc ttttigataa tctcatgacc aaaatccctt 4920
aacgtgagtt ttcgttccac tgaggcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980
gagatcctt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaaacca ccgctaccag 5040
cggtggtttgc tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5100
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagcc gtagtttaggc caccacttca 5160
agaactctgt agcaccgcct acataccctcg ctctgctaatt cctgttacca gtggctgctg 5220
ccagtgccga taagtctgtt ctaccgggt tggactcaag acgatagttt ccggataagg 5280
cgcagcggc gggctgaacg ggggttgcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgaccc 5340
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgc ttcccgaaggaa 5400
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5460
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgcccac ctctgacttg 5520
agcgtcgatt ttgtgtatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580
cgccctttt acggttcctg gcctttgc ggcctttgc tcacatgttc ttccctgcgt 5640
tatccctga ttctgtggat aaccgttata ccgccttga gtgagctgat accgctcgcc 5700
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcggagga agcggaaagag cgcccaatac 5760

gcaaaccgcc tctccccgca cgttggccga ttcatataatg cagctggcac gactagagtc 5820
ccgctgaggc ggcgttagcag gtcagccgca ccagcggtgg tcaccaaccg gggtggaacg 5880
gcccggtat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgtt gtgcagggtt 5940
cgcgtgttgc agtccctcgc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gccggtggt 6000
cgactagttc agtgtatggtg atggtgatgt cctcgagatc taagcttgaa tccgcggccg 6060
ctacgtagaa ttcccatggt atatctcctt cttaaagttt aacaaaattt tttctagacg 6120
ccgtccacgc tgcctcctca cgtgacgtga ggtgcaagcc cggacgttcc gcgtgccacg 6180
ccgtgagccg ccgcgtgccg tcggctccct cagccggc ggccgtggta gcccgcctcg 6240
atatgtacac ccgagaagct cccagcgtcc tcctggccg cgatactcga ccaccacgca 6300
cgcacaccgc actaacgatt cggccggcgc tcgattcggc cggcgctcga ttccggccggc 6360
gctcgattcg gccggcgctc gattcggccg ggcgtcgatt cggccgagca gaagagtgaa 6420
caaccacgca ccacgcttcc gctctgcgcg ccgtacccga cctacctccc gcagctcgaa 6480
gcagctcccg ggagtaccgc cgtactcacc cgcctgtgct caccatccac cgacgcaaag 6540
cccaaccgca gcacacccctc tgcaccaagg tgccgaccgt ggcttccgc tcgcagggtt 6600
ccagaagaaa tcgaacgatc cagcgcggca aggttcaaaa agcaggggtt ggiggggagg 6660
aggttttggg ggggtgtcgcc gggataacctg atatggcttt gttttgcgtt gtgcataat 6720
tttccatata gcctcggcgc gtcggactcg aatagtgtat gtggcgccg acagttgccc 6780
catgaaatcc gcaacggggg gcgtgtcgat cgatcggcaaa tggcggtat cgggtgtgt 6840
tccgcaccgg ccgttcgcga cgaacaacct ccaacgaggt cagtaccgga tgagccgcga 6900
cgacgcattt gcaatgcggt acgtcgagca ttccaccgcac gcgttgctcg gatctatcgt 6960
catcgactgc gatcacgttg acgcccgcgt ggcgcattt cagcaaccat ccgaccatcc 7020
ggcgccgaac tgggtgcac aatcgccgtc cggccgcgc cacaatcgat ggtggctcg 7080
ccccaaaccac gtgtgcccga ccgacagcgc cgcactgacg ccactgcgt acgcccaccg 7140
catcgaaacc ggcctcaaga tcagcgatgg cggcgatttc gcgtatggcg ggcaactgac 7200
caaaaacccg attcaccccg attgggagac gatctacggc cggccaccc cgtacacatt 7260
gcggcagctg gccaccatcc acacaccccg gcagatgcgc cgtcgcccg atcggccgt 7320
gggcctggc cgcacacgtca ccatgttcga cggccacccgg cgtatggcat acccgcatgt 7380
gtggcaacac cgaaacggaa cggccgcga ctgggaccat ctcgtcctgc agcactgcac 7440
cgccgtcaac accgagttca cgacaccact gccgttcacc gaagtacgcg ccaccgcga 7500

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

atccatctcc aaatggatct ggcgcaattt caccgaagaa cagtaccgag cccgacaagc 7560
gcatctcggt caaaaaggcg gcaaggcaac gacactcgcc aaacaagaag ccgtccgaaa 7620
caatgcaaga aagtacgacg aacatacgat gcgagaggcg attatctgat gggcggagcc 7680
aaaaatccgg tgcgccgaaa gatgacggca gcagcagcag ccgaaaaatt cggtgccctcc 7740
actcgaccaa tccaacgctt gtttgcgttag ccgcgtgacg attacctcggt ccgtgcgaaa 7800
gctcgccgtg acaaagctgt cgagctgcgg aagcaggggt tgaagtaccg ggaaatcgcc 7860
gaagcgtatgg aactctcgac cgggatcgac ggccgattac tgcacgacgc ccgcaggcac 7920
ggcgagattt cagcggagga tctgtcgccg taaccaagtc agcgggttgt cgggttccgg 7980
ccggcgctcg gcactcggac cggccggcgg atggtgttct gcctctggcg cagcgtcagc 8040
taccgcccggaa ggcctgtcat cgaccggctt cgactgaagt atgagcaacg tcacagcctg 8100
tgattggatg atccgctcac gctcgaccgc tacctgttca gctgccgccc gctgggcatg 8160
agcaacggcc aactctcggtt caa 8183

<210> 112

<211> 8123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector

pTip·LCH1

<400> 112

gagctcgacc ggcgggtcc cggacgggaa agagcgggaa gctttgccag agagcgcacga 60
cttcccccttg cgttgggtat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgac gcgttagggtg 120
tcacacccca ggaatcgctt cactgaacac agcagccgtt aggacgacca tgactgagtt 180
ggacaccatc gcaaattccgtt ccgatccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240
gtcacgatcc aacataaaaga caacgtttagt cgaggacgtc gagccctca tgcacagcat 300
cgcgccggg gtggagttca tcgaggatcta cggcagcgcac agcagtcctt ttccatctga 360

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accggtccgc ctcatcgact cctcgatcg 420
cccgccagg ttccggcgata tcgcgagccg gcgtggggac gtcgtcggt tcgacgggt 480
gaagatcgtc gggAACATCG gcgcgatagt acgcacgtcg ctgcgcgtcg gagcgtcggg 540
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgccggac cggcggtc aaaaaaaaaaaaaaa 600
ccgaggttac gtcttctccc ttcccggtcgt tctctccggc cgcgaggagg ccatcgcc 660
cattcggac agcggtatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca ttccgtgaa 720
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc ctggctgttc ggcagcgaaa agggtgggccc 780
ttccgacctg ttccgaggagg cgtcttccgc ctgggttcc atccccatga tgagccagac 840
cgagtcttc aacgtttccg ttccctcgg aatcgccgtg cacgagagga tcgacagggaa 900
tctcgccgc aaccgataag cgcctctgtt cctcgacgc tcggttcc gacccgtt 960
cgtcagtgtatgatcaccctca cacggcagcg atcaccactg acatatcgag gtcaacggtc 1020
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcgc ggccgacgccc ctggtaacgac tcgatgactc 1080
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgctttaggc ttgaccccg 1140
agcctgcattg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaaatgc cccggcacc cggccttcc 1200
agcaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1260
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgat catcctcgcc accgtcaccc tggatgctgt 1320
aggcatagggc ttggttatgc cggtaactgcc gggcctcttgc cggatatcg tccattccga 1380
cagcatcgcc agtcaactatg gcgtgctgt agcgctatat gcgttgaatgc aatttctatg 1440
cgcacccgtt ctcggagcac tgcgtcgacc ctttggccgc cgcccagtc tgctcgcttc 1500
gctactttggaa gccactatcg actacgcgtat catggcgacc acacccgtcc tgtggattct 1560
ctacgcccggaa cgcattcgatgg ccggcatcac cggcgccaca ggtgcgggttg ctggcgccata 1620
tatcgccgac atcaccgatg ggaaagatcg ggctcgccac ttccggctca tgagcgcttg 1680
tttcggcgatg ggtatggatgg caggccccgt ggccggggga ctgttggcgcc ccatctcc 1740
gcatgcacca ttcccttgcgg cggcggtgct caacggcctc aacctactac tgggctgctt 1800
cctaattgcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgtatg cccttggagag ccttcaaccc 1860
agtcaatcgatcc ttccggatgg cgcggggcat gactatcgatc gccgcactta tgactgtctt 1920
ctttatcatg caactcgatg gacagggtgcc ggcagcgatc tgggtcattt tcggcgagga 1980
ccgctttcgcc tggagcgca cgtatgtatcg cctgtcgctt gcggatattcg gaatcttgc 2040
cgccctcgatcc caaggcattcg tcactggatcc cgccacccaaa cggttgcggcg agaaggcaggc 2100

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgt gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgcg 2160
aggctggatg gccttccccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggaatgcccgc 2220
gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgaccat cagggacagc ttcaaggatc 2280
gctcgcgct cttaccagcc taacttcgtat cattggaccg ctgatcgtca cggcgattta 2340
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gttaggcgcg ccctataacct 2400
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctcga cctgaatgga 2460
agccggcggc acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2520
cgaggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcgc gtccgcccattc 2580
tccagcagcc gcacgcggcg catctcggc agcggtgggt cctggccacg ggtgcgcattg 2640
atcgtgcctc tgtcggttgcg gactagaatt gatctcctcg accgccaatt gggcatctga 2700
gaatcatctg cgtttctcgc acgcaacgtt cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2760
atcacaccccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2820
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcgccc 2880
gagtgcacgtt ggcgcacgctg caccactacg acgacatcgg cctgctcgta ccgagcgagc 2940
gcagccacgc gggccaccgg cgctacagcg acgcccaccc tggccggctg cagcagatcc 3000
tgttctaccg ggagctggc ttcccgctcg acgaggtcgc cgccctgctc gacgaccgg 3060
ccgcggaccc ggcgcgcac ctgcgcgcac agcacgagct gctgtccgcg cggatcgaaa 3120
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atggaaatca 3180
acctcaccccc ggaggagaag ttcgaggatct tcggcgactt cgaccccgac cagtagcagg 3240
aggaggtccg ggaacgcgtgg gggAACACCG acgcctaccg ccagtccaa gagaagaccg 3300
cctcgtaacac caaggaggac tggcagcgcac tccaggacga ggccgacgag ctacccggc 3360
gcttcgtcgc cctigatggac gcggtgagc ccgcgcactc cgagggggcg atggacgcgc 3420
ccgaggacca ccggcaggac atcgccgcac accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3480
cctgcctggc cgagatgtac gtgtccgcac aacgtttcac gcgaaacatc gacgcccaca 3540
agccgggcct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgc caacgcgcgc cgccacaccc 3600
cctgagcggt ggtcggtggcc cgggtctccc gcccggctc accccacggc tcactccgg 3660
gccacgcacca ccggcgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgcctccgtc 3720
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtcagg tggcacttt cggggaaatg 3780
tgcgcggaac ccctatgtt ttatTTTCT aaatacattc aaataatgtat ccgctcatga 3840

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3900
atttccgtgt cgcccttatt cccttttg cggcattttg ctttcgtt tttgctcacc 3960
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtcacga gtgggttaca 4020
tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagtt tcgccccgaa gaacgtttc 4080
caatgatgag cactttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatccgt attgacgccc 4140
ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4200
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgcgtcc 4260
taaccatgag tgataaacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4320
agctaaccgc tttttgcac aacatgggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4380
cgtagctgaa tgaagccata ccaaaccgacg agcgtgacac cacgatgcct gttagcaatgg 4440
caacaacgtt gcgc当地acta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4500
taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgtcg gccc当地ccgg 4560
ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccgggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4620
cagcactggg gccagatgggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4680
aggcaactat ggtatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 4740
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatactta gattgattt aaacttcatt 4800
ttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4860
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4920
gagatcctt tttctgcgc gtaatctgct gcttgcaac aaaaaaaccac ccgttaccag 4980
cggtggtttgc tttgcccggat caagagctac caactcttt tccgaaggta actggcttca 5040
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagcc gtagtttaggc caccacttca 5100
agaactctgt agcaccgcct acataccctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg 5160
ccagtggcga taagtctgtt cttaccgggt tggactcaag acgatagttt ccggataagg 5220
cgccaggcgtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgaccc 5280
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgcctt cccgaaggaa 5340
gaaaggcggaa caggtatccg gtaagcggca gggtcggaaac aggagagcgc acgagggagc 5400
ttccagggggg aaacgcctgg tattttata gtcctgtcggtt tttcgccac ctctgacttg 5460
agcgtcgatt ttgtgtatgc tcgtcagggg ggcggagcctt atggaaaaac gccagcaacg 5520
cgccctttt acggttcctg gcctttgtt ggcctttgc tcacatgttc tttcgtcgtt 5580

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgccttga gtgagctgat accgctcgcc 5640
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaaagag cgcccaatac 5700
gcaaaccgcc tctccccgcg cggtggccga ttcatattaatg cagctggcac gactagagtc 5760
ccgctgagggc ggcgttagcag gtcagccgcc ccagcggtgg tcaccaaccg gggtggaaacg 5820
gcccggat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaacct ccgtgtgtt gtgcagggtt 5880
cgcgtgttgc agtcccctcgc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gccggtggtt 5940
cgactagttc agtgtatggtg atggtgatgt cctcgagatc taagcttgga tccgcggccg 6000
ctacgtagaa ttcccatggt atatctcctt cttaaagttt aacaaaattt tttctagacg 6060
ccgtccacgc tgcctcctca cgtgacgtga ggtgcaagcc cggacgttcc gcgtgccacg 6120
ccgtgagccg ccgcgtgccc tcggctccct cagccccggc ggccgtggga gcccgcctcg 6180
atatgtacac ccgagaagct cccagcgtcc tcctgggccc cgataactcga ccaccacgca 6240
cgcacacccgc actaacgatt cggccggcgc tcgattcggc cggcgctcga ttccggccggc 6300
gctcgattcg gccggcgctc gattcggccg gcgcgtcgatt cggccgagca gaagagtgaa 6360
caaccaccga ccacgcttcc gctctgcgcg ccgtacccga cctacctccc gcagctcgaa 6420
gcagctcccg ggagtaccgc cgtactcacc cgcctgtgct caccatccac cgacgcaaag 6480
cccaaccaccga gcacacccctt tgacccaagg tgccgaccgt ggcttccgc tcgcagggtt 6540
ccagaagaaa tcgaacgatc cagcgcggca aggttcaaaa agcaggggtt ggtggggagg 6600
aggtttggg ggggtgtcgcc gggataacctg atatggctt gttttgcgtt gtgcataat 6660
tttccatata gcctcggcgc gtcggactcg aatagttgat gtggcgggc acagttgccc 6720
catgaaatcc gcaacggggg gcgtgctgag cgatcggcaa tggcggatg cgggtgtgct 6780
tccgcaccgg ccgttgcga cgaacaacct ccaacgaggt cagtaccgga tgagccgcga 6840
cgacgcattt gcaatgcggt acgtcgagca ttccacccac gcgttgctcg gatctatcgt 6900
catcgactgc gatcacgtt acgcccgcgt ggcgcatttcc gagcaaccat ccgaccatcc 6960
ggcgccgaac tgggtgcac aatcgccgtc cggccgcga cacatcgat ggtggctcgg 7020
cccccaaccac gtgtgcccga ccgacagcgc ccgactgacg ccactgcgt acgcccaccg 7080
catcgaaacc ggcctcaaga tcagcgtcg cggcgatttc gcgtatggcg ggcaactgac 7140
caaaaacccg attcaccccg attgggagac gatctacggc cggccaccc cgtacacatt 7200
gcggcagctg gccaccatcc acacaccccg gcagatgccc cgtcggcccg atcggccgt 7260
gggcctggc cgcaacgtca ccatgttcga cgccacccgg cgtatggcat acccgcagt 7320

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

gtggcaacac cgaaacggaa ccggccgcga ctgggaccat ctgcgcctgc agcaactgcca 7380
cgccgtcaac accgagttca cgacaccact gccgttcacc gaagtacgcg ccaccgcgca 7440
atccatctcc aaatggatct ggcccaattt caccgaagaa cagtaccgag cccgacaagc 7500
gcatctcggt caaaaaggcg gcaaggcaac gacactcgcc aaacaagaag ccgtccgaaa 7560
caatgcaaga aagtacgacg aacatacgat gcgagaggcg attatctgat gggcggagcc 7620
aaaaatccgg tgcgccgaaa gatgacggca gcagcagcag ccgaaaaatt cggtgccctcc 7680
actcgcacaa tccaacgctt gtttgcgtgag ccgcgtgacg attacctcg 7740
gctcgccgtg acaaagctgt cgagctgcgg aagcaggggt tgaagtaccg ggaaatcgcc 7800
gaagcgtatgg aactctcgac cgggatcgac ggccgattac tgcacgacgc ccgcaggcac 7860
ggcgagattt cagcggagga tctgtcggcg taaccaagtc agcgggttgt cgggttccgg 7920
ccggcgctcg gcactcggac cggccggcgg atggtgttct gcctctggcg cagcgtcagc 7980
taccgcccggaa ggcctgtcat cgaccggctt cgactgaagt atgagcaacg tcacagcctg 8040
tgattggatg atccgctcac gctcgaccgc tacctgttca gctgccgccc gctgggcatg 8100
agcaacggcc aactctcggtt caa 8123

<210> 113

<211> 8184

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:vector

pTip·LCH2

<400> 113

gagctcgacc ggcgggtcc cggacgggaa agagcgggaa gctttgccag agagcgcacga 60
cttcccccgtt cgttgggtat tgccggtcag ggcagccatc cgccatcgac gcgtagggtg 120
tcacacccca ggaatcgctt cactgaacac agcagccgtt aggacgacca tgactgagtt 180
ggacaccatc gcaaatccgtt ccgatccgc ggtgcagcgg atcatcgatg tcaccaagcc 240

gtcacgatcc aacataaaga caacgttgcgagccatc 300
cgccggccggg gtggagttca tcgaggtcta cggcagcgac agcagtcctt ttccatctga 360
gttgctggat ctgtgcgggc ggcagaacat accgggtccgc ctcatcgact cctcgatcgt 420
caaccagttg ttcaaggggg agcggaaaggc caagacattc ggcacatcgcc gcgccctcg 480
cccgccagg ttcggcgata tcgagcccg gcgtggggac gtcgtcggt tcgacgggt 540
gaagatcgtc gggAACATCG ggcgtatgt acgcacgtcg ctcgcgtcgt gagggtcg 600
gatcatcctg gtggacagtg acatcaccag catcgccgac cggcgtctcc aaaggccag 660
ccgaggttac gtcttctccc ttcccggt tctctccgt cgcgaggagg ccatcgcc 720
cattcggac agcggatatgc agctgatgac gctcaaggcg gatggcgaca ttccgtgaa 780
ggaactcggg gacaatccgg atcggctggc ctggctgtc ggcagcgaaa aggggtggcc 840
ttccgacctg ttcgaggagg cgtcttccgc ctgggttcc atccccatga tgagccagac 900
cgagtcttc aacgtttccg ttccctcgg aatcgccgt cacgagagga tcgacaggaa 960
tctcgccgaa aaccgataag cgcctctgtt cctcgacgc tcggttccctc gaccctcgatt 1020
cgtcagtatgatgatc acatcgatc acatcgatc acatatcgatgt gtcacggtc 1080
gtggtccggg cgggcactcc tcgaaggcg gcgcgacgccc ctggatcgac tcgatgactc 1140
tagagtaacg ggctactccg tttaacggac cccgttctca cgctttaggc ttgacccgg 1200
agcctgcattg gggcattccg ccgtgaaccc ggtggaaatgc cccggcacc cgggctttcc 1260
agcaaaagatc acctggcgcc gatgagtaag gcgtacagaa ccactccaca ggaggaccgt 1320
cgagatgaaa tctaacaatg cgctcatcgat catcctcgcc accgtcaccc tggatgtgt 1380
aggcataggc ttggttatgc cggtactgccc gggcctcttgc cgggatatcg tccattccga 1440
cagcatcgcc agtcaactatg gcgtgtcgat agcgctatata gcttgcgtatgc aatttctatg 1500
cgcacccgtt ctggagcac tgtccgaccgc ctggccgc cggccagtc tgctcgcttc 1560
gctacttggc gccactatcg actacgcat catggcgacc acacccgtcc tggatgtgt 1620
ctacgcccga cgcacatcgatcc ccggcatcac cggccacaca ggtgcgggttgc ctggcgccata 1680
tatcgccgac atcaccgatg ggaaagatcg ggctcgccac ttgggtcgatca tgagcgctt 1740
tttcggcgatg ggtatggatgg caggccccgt ggccggggga ctgttggcgcc ccatctcc 1800
gcatgcacca ttcccttgcgg cggcggtgcgt caacggccctc aacctactac tggatgtgtt 1860
cctaattgcag gagtcgcata agggagagcg tcgtccgtatgc cccttgcgatgc ccttcaaccc 1920
agtcaactcc ttccggatgg cgcggggcat gactatcgatc gccgcacccat tggatgtgtt 1980

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

ctttatcatg caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga 2040
ccgccttcgc tggagcgcga cgatgatcg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgc 2100
cgccctcgct caagccttcg tcactggtcc cgccacccaa cgtttcggcg agaaggcaggc 2160
cattatcgcc ggcatggcgg ccgacgcgct gggctacgtc ttgctggcgt tcgcgacgct 2220
aggctggatg gccttccccca ttatgattct tctcgcttcc ggcggcatcg ggatgcccgc 2280
gttgcaggcc atgctgtcca ggcaggtaga tgacgaccat cagggacagc ttcaaggatc 2340
gctcgcgctt cttaaccagcc taacttcgtat cattggaccg ctgatcgta cggcgattta 2400
tgccgcctcg gcgagcacat ggaacgggtt ggcattggatt gttaggcggc ccctataacct 2460
tgtctgcctc cccgcgttgc gtcgcgggtgc atggagccgg gccacacctga cctgaatgga 2520
agccggcgcc acctcgctaa cggattcacc actccaaagaa ttggagccaa tcaattcttg 2580
cgaggagaactg tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcgct gtccgcccattc 2640
tccagcagcc gcacgcggcg catctcggtt agcgttgggt cctggccacg ggtgcgcattg 2700
atcgtgctcc tgtcggtttag gactagaatt gatctccctcg accgccaatt gggcatctga 2760
gaatcatctg cgtttctcgac acgcaacgtt cttgcaacgt tgcaactcct agtgttgtga 2820
atcacaccccc accgggggggt gggattgcag tcaccgattt ggtgggtgcg cccaggaaga 2880
tcacgtttac ataggagctt gcaatgagct actccgtggg acaggtggcc ggcttcggcc 2940
gagtgacggt ggcgcacgctg caccactacg acgacatcg cctgctcgta ccgagcgagc 3000
gcagccacgc gggccacccgg cgctacagcg acgcccaccc cgaccggctg cagcagatcc 3060
tgttctaccg ggagctgggc ttcccgctcg acgagggtgcg cgccctcgctc gacgaccgg 3120
ccgcggaccc gcgcgccgac ctgcggccgac agcacgagct gctgtccgcc cggatcggga 3180
aactgcagaa gatggcggcg gccgtggagc aggcgatgga ggcacgcagc atgggaatca 3240
acctcaccccc ggaggagaag ttcgaggatct tcggcgactt cgaccccgac cagtacgagg 3300
aggaggtccg ggaacgctgg gggAACACCG acgcctaccg ccagtccaaag gagaagaccc 3360
cctcgtaacac caaggaggac tggcagcgca tccaggacga ggccgacgag ctcacccggc 3420
gcttcgtcgc cctgatggac gcgggtgagc ccgcccaccc cgagggggcg atggacgccc 3480
ccgaggacca ccggcaggac atgcggccgca accactacga ctgcgggtac gagatgcaca 3540
cctgcctggg cgagatgtac gtgtccgacg aacgtttcac gcgaaacatc gacgcccggca 3600
agccggccct cgccgcctac atgcgcgacg cgatcctcgctc caacgcgcgtc cggcacacccc 3660
cctgagcggt ggtcggtggcc cgggtctccc gcccgggtctc accccacggc tcactccgg 3720

gccacgacca ccgccgtccc gtacgcgcac acctcggtgc ccacgtccgc cgccctccgtc 3780
acgtcgaaac ggaagatccc cgggtaccga gctcgtaagg tggcacttt cggggaaatg 3840
tgcgcggaac ccctatttgc ttattttct aaatacattc aaatatgtat ccgcgtcatga 3900
gacaataacc ctgataaaatg cttaataat attgaaaaag gaagagtgatg agtattcaac 3960
atttccgtgt cgcccttatt ccctttttg cggcattttg ctttcctgtt ttgcgtcacc 4020
cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt gggtgcacga gtgggttaca 4080
tcgaactgga tctcaacagc ggttaagatcc ttgagagttt tcgcggcggaa gaacgtttc 4140
caatgatgag cactttaaa gttctgctat gtggcgcgtt attatccgtt attgacgccc 4200
ggcaagagca actcggtcgc cgcatcact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4260
cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4320
taaccatgag tgataaacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4380
agctaaccgc tttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4440
cgagactgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gttagcaatgg 4500
caacaacgtt gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4560
taatagactg gatggagggcg gataaagtgg caggaccact tctgcgcctcg gcccttccgg 4620
ctggctgggtt tattgctgat aaatctggag ccggtagcgtt tgggtctcgc ggtatcattt 4680
cagcactggg gccagatggtt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4740
aggcaactat ggttgcacaa aatagacaga tcgttgatgat aggtgcctca ctgatggc 4800
attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgatttta aaacttcatt 4860
tttaatttaa aaggatcttag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4920
aacgtgagtt ttgcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4980
gagatccctt tttctgcgc gtaatctgct gcttgcacaaac aaaaaaaacca ccgcgtaccag 5040
cggtgggttgc tttgcggat caagagctac caactcttt tccgaaggta actggcttca 5100
gcagagcgca gataccaaat actgttcttc tagttagcc gtagtttaggc caccacttca 5160
agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg 5220
ccagtggcga taagtcgtgt cttaaccgggt tggactcaag acgatagttt ccggataagg 5280
cgccagcggcgtc gggctgaacg ggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgaccc 5340
acaccgaact gagataccaa cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 5400
gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgaggggagc 5460

ttccaggggg aaacgcctgg tatcttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5520
agcgtcgatt ttgtgtatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5580
cggcctttt acggttcctg gcctttgct ggcctttgc tcacatgttc ttccctgcgt 5640
tatccctga ttctgtggat aaccgttata ccgccttga gtgagctgat accgctcgcc 5700
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaaagag cgcccaatac 5760
gcaaaccgcc tctccccgct cggtggccga ttcatatgc cagctggcac gactagagtc 5820
ccgctgagggc ggcgtagcag gtcagccgcc ccagcggtgg tcaccaaccg gggtggaacg 5880
gcgcggat cgggtgtgtc cgtggcgctc attccaaacct ccgtgtgtt gtgcaggitt 5940
cgcgtgtgc agtccctcgc accggcaccc gcagcgaggg gctcacgggt gccggtggtt 6000
cgactatgtc agtgatggtg atggtgatgt cctcgagatc taagcttgaa tccgcggccg 6060
ctacgtagaa ttcccatatg tataatctcct tcttaaagtt aaacaaaatt attctagac 6120
gccgtccacg ctgcctccctc acgtgacgtg aggtgcaagc ccggacgttc cgctgtccac 6180
gccgtgagcc gccgcgtgcc gtcggctccc tcagcccggtt cggccgtggg agccgcctc 6240
gatatgtaca cccgagaagc tcccagcgtc ctccctggcc gcgataactcg accaccacgc 6300
acgcacacccg cactaacgat tcggccggcg ctgcattcgg ccggcgctcg attcgccgg 6360
cgctcgattc ggccggcgct cgattcgcc ggcgttcgtat tcggccgagc agaagagtga 6420
acaaccacccg accacgcttc cgctctgcgc gccgtacccg acctacccctc cgctgtcg 6480
agcagctccc gggagtaccg ccgtactcac ccgcctgtgc tcaccatcca ccgacgcaaa 6540
gcccaacccg agcacacccctc ttgcaccaag gtgccgaccg tggctttccg ctgcagggt 6600
tccagaagaa atcgaacgat ccagcgcggc aaggttcaaa aagcaggggt tggtgggag 6660
gaggttttgg ggggtgtcgc cggataacct gatatggctt tggctttccg agtgcataaa 6720
tttccatat agcctcgccg cgtcgactc gaatagttga tgtggccgg cacagttgcc 6780
ccatgaaatc cgcaacgggg ggcgtgctga gcgatcgca atggcgat ggcgtgttgc 6840
ttccgcacccg gccgttcgcg acgaacaacc tccaacgagg tcagtaccgg atgagcccg 6900
acgacgcatt ggcaatgcgg tacgtcgagc attcaccgca cgcgttgctc ggatctatcg 6960
tcatcgactg cgatcacgtt gacgcccgcga tgcgcgcatt cgagcaacca tccgaccatc 7020
cggcgccgaa ctgggtcgca caatcgccgt ccggccgcgc acacatcgga tggtggtc 7080
gcccccaacca cgtgtgcccgc accgacagcgc cccgactgac gccactgcgc tacgcccacc 7140
gcatcgaaac cggcctcaag atcagcgtcg gcggcgattt cgctatggc gggcaactga 7200

WO 2004/016792

PCT/JP2003/010209

ccaaaaaccc gattcacccc gattgggaga cgatctacgg cccggccacc ccgtacacat 7260
tgcggcagct ggccaccatc cacacacccc ggcagatgcc gcgtcgccc gatcgcccg 7320
tgggcctggg ccgcaacgtc accatgttcg acgccacccg gcgtatggca taccgcagt 7380
ggtgtggcaaca ccgaaacgga accggccgcg actgggacca tctcgctcg cagcactgcc 7440
acgccgtcaa caccgagttc acgacaccac tgccgttac cgaagtacgc gccaccgcgc 7500
aatccatctc caaatggatc tggcgcaatt tcaccgaaga acagtaccga gcccgacaag 7560
cgcatctcg tcaaaaaggc ggcaaggcaa cgacactcgc caaacaagaa gccgtccgaa 7620
acaatgcaag aaagtacgac gaacatacga tgcgagaggc gattatctga tggcgaggc 7680
caaaaatccg gtgcgcccga agatgacggc agcagcagca gccgaaaaat tcggtgccctc 7740
cactcgacaca atccaacgct tgttgctga gccgcgtgac gattacctcg gccgtgcgaa 7800
agctcgccgt gacaaagctg tcgagctcgc gaagcagggg ttgaagtacc gggaaatcgc 7860
cgaagcgatg gaactctcga ccgggatcgt cggccgatta ctgcacgacg cccgcaggca 7920
cgccgagatt tcagcggagg atctgtcggc gtaaccaagt cagcgggttg tcgggttccg 7980
gccggcgctc ggcactcgga ccggccggcg gatgggttgc tgcctctggc gcagcgtcag 8040
ctaccgcccga aggccctgtca tcgaccggct tcgactgaag tatgagcaac gtcacagcct 8100
tgtgattggat gatccgctca cgctcgaccg ctacctgttc agctgccgcc cgctggcat 8160
gagcaacggc caactctcgt tcaa 8184

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10209

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/74, C12N1/21, C12P21/02, C12Q1/02, C12Q1/68,
C07K14/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/74, C12N1/21, C12P21/02, C12Q1/02, C12Q1/68,
C07K14/47

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/03521 A1 (LASTER M.C.), 08 February, 1996 (08.02.96), & AU 9531311 A & EP 772691 A1 & US 5654169 A & US 5726039 A & JP 10-503090 A	1-2, 7-11, 16-18
X	MUJACIC, M. et al., Cold-inducible cloning vectors for low-temperature protein expression in Escherichia coli: application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein., Gene 1999, Vol.238, No.2, pages 325 to 332	1-2, 7-11, 16-18

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 September, 2003 (16.09.03)Date of mailing of the international search report
30 September, 2003 (30.09.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/10209

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE MOT, R. et al., Structural analysis of the 6 kb cryptic plasmid pFAJ2600 from <i>Rhodococcus erythropolis</i> NI86/21 and construction of <i>Escherichia coli</i> - <i>Rhodococcus</i> shuttle vectors., <i>Microbiology</i> 1997, Vol.143, Pt.10, pages 3137 to 3147	1-42
Y	JP 10-248578 A (Nitto Chemical Industry Co., Ltd.), 22 September, 1998 (22.09.98), (Family: none)	1-42
Y	EP 1127943 A2 (ENITECNOLOGIE SPA), 29 August, 2001 (29.08.01), (Family: none)	1-42
Y	TAKANO, E. et al., Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in <i>Streptomyces</i> spp., <i>Gene</i> 1995, Vol.166, No.1, pages 133 to 137	1-42
Y	ENGUITA, F.J. et al., An inducible expression system of histidine-tagged proteins in <i>Streptomyces lividans</i> for one-step purification by Ni ²⁺ affinity chromatography., <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> 1996, Vol.137, Nos. 2 to 3, pages 135 to 140	1-42
X	LOWELL, C.A. et al., Structure of the murine serum amyloid A gene family: Gene conversion., <i>J.Biol. Chem.</i> 1986, Vol.261, No.18, pages 8442 to 8452	42
X	KAWAI, J. et al., Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection., <i>Nature</i> 2001, Vol.409, No.6821, pages 685 to 690	42
X	WO 01/48192 A1 (GENESIS RES. & DEV. CORP. LTD.), 05 July, 2001 (05.07.01), & AU 200124134 A & US 6380362 B1	42
X	VAN DER VLIET, H.N. et al., Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration., <i>J.Biol.Chem.</i> 2001, Vol.276, No.48, pages 44512 to 44520	42
X	GRUSBY, M.J. et al., Molecular cloning of mouse cathepsin D., <i>Nucleic Acids Res.</i> 1990, Vol.18, No.13, page 4008	42
X	DEGEN, S.J. et al., Characterization of the cDNA coding for mouse prothrombin and localization of the gene on mouse chromosome 2., <i>DNA Cell Biol.</i> 1990, Vol.9, No.7, pages 487 to 498	42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10209

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EVANS, B.A. et al., Mouse glandular kallikrein genes. Structure and partial sequence analysis of the kallikrein gene locus., J.Biol.Chem. 1987, Vol.262, No.17, pages 8027 to 8034	42
X	BARON, W.F. et al., Cloning and characterization of an actin-resistant DNase I-like endonuclease secreted by macrophages., Gene 1998, Vol.215, No.2, pages 291 to 301	42
X	SHIOKAWA, D. et al., DLAD, a novel mammalian divalent cation-independent endonuclease with homology to DNase II., Nucleic Acids Res. 1999, Vol.27, No.20, pages 4083 to 4089	42
X	FERRARI, S. et al., The mouse gene coding for high mobility group 1 protein(HMG1)., J.Biol.Chem. 1994, Vol.269, No.46, pages 28803 to 28808	42
X	TEKKI-KESSARIS, N. et al., Characterization of the mouse Kid1 gene and identification of a highly related gene, Kid2., Gene 1999, Vol.240, No.1, pages 13 to 22	42
X	OLTVAI, Z.N. et al., Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death., Cell 1993, Vol.74, No.4, pages 609-619	42
X	POSTIC, C. et al., Cloning and characterization of the mouse glucokinase gene locus and identification of distal liver-specific DNase I hypersensitive sites., Genomics 1995, Vol.29, No.3, pages 740 to 750	42
X	HOLZL, H. et al., The regulatory complex of Drosophila melanogaster 26S proteasomes. Subunit composition and localization of a deubiquitylating enzyme., J.Cell Biol. 2000, Vol.150, No.1, pages 119 to 130	42
X	ROCK, C.O. et al., Pantothenate kinase regulation of the intracellular concentration of coenzyme A., J.Biol.Chem. 2000, Vol.275, No.2, pages 1377 to 1383	42
X	WONG, C.M. et al., Characterization of human and mouse peroxiredoxin IV: evidence for inhibition by Prx-IV of epidermal growth factor- and p53-induced reactive oxygen species., Antioxid.Redox Signal. 2000, Vol.2, No.3, pages 507 to 518	42

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/10209

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' C12N 15/74, C12N 1/21, C12P 21/02, C12Q 1/02, C12Q 1/68, C07K 14/47

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' C12N 15/74, C12N 1/21, C12P 21/02, C12Q 1/02, C12Q 1/68, C07K 14/47

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 96/03521 A1 (LASTER M. C.) 1996.02.08 & AU 9531311 A & EP 772691 A1 & US 5654169 A & US 5726039 A & JP 10-503090 A	1-2, 7-11, 16-18
X	MUJACIC, M. et al. Cold-inducible cloning vectors for low- temperature protein expression in Escherichia coli: application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein. Gene 1999, Vol. 238, No. 2, p. 325-332	1-2, 7-11, 16-18

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 09. 03

国際調査報告の発送日

30. 09. 03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

高堀 栄二

4 B 9281



電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		国際出願番号 PCT/JP03/10209
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	DE MOT, R. et al. Structural analysis of the 6 kb cryptic plasmid pFAJ2600 from <i>Rhodococcus erythropolis</i> NI86/21 and construction of <i>Escherichia coli</i> - <i>Rhodococcus</i> shuttle vectors. <i>Microbiology</i> 1997, Vol. 143, Pt. 10, p. 3137-3147	1-42
Y	JP 10-248578 A (日東化学工業株式会社) 1998. 09. 22 (ファミリーなし)	1-42
Y	EP 1127943 A2 (ENITECNOLOGIE SPA) 2001. 08. 29 (ファミリーなし)	1-42
Y	TAKANO, E. et al. Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in <i>Streptomyces</i> spp. <i>Gene</i> 1995, Vol. 166, No. 1, p. 133-137	1-42
Y	ENGUITA, F. J. et al. An inducible expression system of histidine-tagged proteins in <i>Streptomyces lividans</i> for one-step purification by Ni ²⁺ affinity chromatography. <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> 1996, Vol. 137, No. 2-3, p. 135-140	1-42
X	LOWELL, C. A. et al. Structure of the murine serum amyloid A gene family: Gene conversion. <i>J. Biol. Chem.</i> 1986, Vol. 261, No. 18, p. 8442-8452	42
X	KAWAI, J. et al. Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. <i>Nature</i> 2001, Vol. 409, No. 6821, p. 685-690	42
X	WO 01/48192 A1 (GENESIS RES & DEV CORP LTD) 2001. 07. 05 & AU 200124134 A & US 6380362 B1	42
X	VAN DER VLIET, H. N. et al. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. <i>J. Biol. Chem.</i> 2001, Vol. 276, No. 48, p. 44512-44520	42
X	GRUSBY, M. J. et al. Molecular cloning of mouse cathepsin D. <i>Nucleic Acids Res.</i> 1990, Vol. 18, No. 13, p. 4008	42
X	DEGEN, S. J. et al. Characterization of the cDNA coding for mouse prothrombin and localization of the gene on mouse chromosome 2. <i>DNA Cell Biol.</i> 1990, Vol. 9, No. 7, p. 487-498	42

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/10209

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EVANS, B. A. et al. Mouse glandular kallikrein genes. Structure and partial sequence analysis of the kallikrein gene locus. J. Biol. Chem. 1987, Vol. 262, No. 17, p. 8027-8034	42
X	BARON, W. F. et al. Cloning and characterization of an actin-resistant DNase I-like endonuclease secreted by macrophages. Gene 1998, Vol. 215, No. 2, p. 291-301	42
X	SHIOKAWA, D. et al. DLAD, a novel mammalian divalent cation-independent endonuclease with homology to DNase II. Nucleic Acids Res. 1999, Vol. 27, No. 20, p. 4083-4089	42
X	FERRARI, S. et al. The mouse gene coding for high mobility group 1 protein(HMG1). J. Biol. Chem. 1994, Vol. 269, No. 46, p. 28803-28808	42
X	TEKKI-KESSARIS, N. et al. Characterization of the mouse Kid1 gene and identification of a highly related gene, Kid2. Gene 1999, Vol. 240, No. 1, p. 13-22	42
X	OLTVAI, Z. N. et al. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell 1993, Vol. 74, No. 4, p. 609-619	42
X	POSTIC, C. et al. Cloning and characterization of the mouse glucokinase gene locus and identification of distal liver-specific DNase I hypersensitive sites. Genomics 1995, Vol. 29, No. 3, p. 740-750	42
X	HOLZL, H. et al. The regulatory complex of Drosophila melanogaster 26S proteasomes. Subunit composition and localization of a deubiquitylating enzyme. J. Cell Biol. 2000, Vol. 150, No. 1, p. 119-130	42
X	ROCK, C. O. et al. Pantothenate kinase regulation of the intracellular concentration of coenzyme A. J. Biol. Chem. 2000, Vol. 275, No. 2, p. 1377-1383	42
X	WONG, C. M. et al. Characterization of human and mouse peroxiredoxin IV: evidence for inhibition by Prx-IV of epidermal growth factor- and p53-induced reactive oxygen species. Antioxid. Redox Signal. 2000, Vol. 2, No. 3, p. 507-518	42